

Beeinflussung des intrazellulären
Redoxzustandes der isoliert perfundierten
Rattenleber durch Metyrapon

Vorgelegt von
Stefan Simon

1971



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554425_0074

Aus dem Institut für Pharmakologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Professor Dr. Kuschinsky

Beeinflussung des intrazellulären
Redoxzustandes der isoliert perfundierten
Rattenleber durch Metyrapon

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen
Fakultät der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von
Stefan Simon
aus Leipzig

Mainz 1970

Dekan: Prof. Dr. Dr. W. Ketterl

Referent: Prof. Dr. Netter

Korreferent: Prof. Dr. Kuschinsky

Tag der mündlichen
Prüfung: 15. Juni 1971



gesamtherstellung
ditters bürodienst
mainz

Meinen Eltern in Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	
1) Metyrapon als Hemmstoff von Hydroxylierungsreaktionen	3
2) Die Bedeutung der Substratquotienten	6
3) Zielsetzung der Arbeit	8
METHODEN	
I. Substanzen	10
II. Versuche an der isoliert perfundierten Rattenleber	11
1) Apparatur	11
2) Perfusionsmedium	13
3) Präparat	14
4) Perfusion	15
5) Bestimmung der Substratkonzentrationen	16
6) Sauerstoffmessungen	18
7) Statistische Auswertung	19
III. Versuche zur Hemmung der Lactatdehydrogenase und der β -Hydroxybutyratdehydrogenase in vitro	19
ERGEBNISSE	
I. Versuche an der isoliert perfundierten Rattenleber	21
a) Substratkonzentrationen und ihre Quotienten	21
1) Lactat	21
2) Pyruvat	23
3) Lactat/Pyruvat-Quotient	24
4) β -Hydroxybutyrat	25
5) Acetoacetat	27
6) β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat-Quotient	28
7) Substratkonzentrationen und Quotienten innerhalb der ersten 20 Minuten nach Metyraponzugabe	30

	Seite
b) Sauerstoffmessungen	31
1) Sauerstoffverbrauch	
2) Kontinuierliche Messung des Sauerstoff- partialdruckes	31
II. Versuche zur Hemmung der Lactatdehydrogenase und der β -Hydroxybutyratdehydrogenase in vitro	33
a) Lactatdehydrogenase	33
1) Substratabhängige Kinetik	33
2) Coenzymabhängige Kinetik	34
b) β -Hydroxybutyratdehydrogenase	35
1) Substratabhängige Kinetik	35
2) Coenzymabhängige Kinetik	36
DISKUSION	
1) Änderungen des intrazellulären Redoxzustandes der isoliert perfundierten Rattenleber durch Metyrapon	38
2) Änderung des Sauerstoffverbrauchs der isoliert perfundierten Rattenleber durch Metyrapon	41
3) Vergleich der Metyraponeffekte mit denjenigen von Amobarbital (Amytal ^R)	43
4) Versuche zur Hemmung der Lactatdehydrogenase und der β -Hydroxybutyratdehydrogenase in vitro	46
ZUSAMMENFASSUNG	49
LITERATURVERZEICHNIS	50
TABELLEN	58

EINLEITUNG

1) Metyrapon als Hemmstoff von Hydroxylierungsreaktionen

Metyrapon (2-methyl-1,2-bis-(3-pyridyl)-1-propanon; SU-4885; DFP; Metopirone^R) wurde 1958 von CHART et al. als Inhibitor des Hormonstoffwechsels in der Nebennierenrinde beschrieben. Die Verbindung gehört zu einer Reihe von Hemmstoffen mit gleichartiger Wirkung, wie auch Amphenon B, die von dem Insektizid DDD (2,2-bis-(p-chlorophenyl)-1,1-dichloroäthan) abgeleitet worden sind. Die Strukturformeln sind in Abb. 1 wiedergegeben.

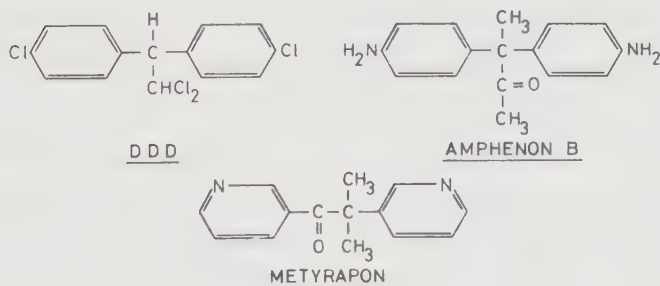


Abb. 1 Strukturformeln einiger Hemmstoffe der Steroidhydroxylierung

Von LITTLE et al. (1958) und JENKINS et al. (1958 und 1959) wurde im gleichen Jahr über eine selektive Hemmung der 11- β -Hydroxylierung der Nebennierenrindensteroiden durch Metyrapon berichtet. Durch diesen Eingriff kann die Bio-

synthese von Nebennierenrindenhormonen, wie Cortisol, Corticosteron und Aldosteron, nur bis zu den 11- β -Desoxyvorstufen ablaufen. In der Folgezeit konnten eine Anzahl von Autoren nachweisen, daß nicht nur die 11- β -Hydroxylierung durch Metyrapon gehemmt wird, sondern auch die Hydroxylierung in 18-Stellung des Steroidmoleküls (KAHNT et al. 1962, KRAULIS et al. 1963, ERICKSON et al. 1966).

Neue Anregungen für eine Anwendung von Metyrapon als Hemmstoff außerhalb der Nebennierenrinde ergaben sich aus dem Bekanntwerden großer Ähnlichkeiten zwischen den Hydroxylasen der Nebennierenrinde und den arzneimittelabbauenden Hydroxylasen in den Lebermikrosomen. Nach Untersuchungen von KUNTZMAN et al. (1964) über die Steroidhydroxylierung in Lebermikrosomen sind die Steroide als physiologische Substrate der arzneimittelabbauenden Leberenzyme aufzufassen. Durch die Arbeiten von ESTABROOK et al. (1963), COOPER et al. (1965) und OMURA et al. (1965) wurde gezeigt, daß die Nebennierenrindenhydroxylasen und die Hydroxylasen des Arzneimittelstoffwechsels in den Lebermikrosomen ein gemeinsames Elektronentransportsystem besitzen, dessen Bestandteile 1968 von COOPER et al. isoliert und teilweise gereinigt wurden. Als Endoxydase fungiert das Cytochrom P 450, das als mixed-function-oxygenase im Sinne von MASON (1957) den Wasserstoff von NADPH mit molekularem Sauerstoff zu Wasser oxydiert und gleichzeitig, unter Ausnutzung der freien Enthalpie der Knallgasreaktion, das zweite Sauerstoffatom in das Akzeptormolekül einbaut. Die Vermutung, daß Metyrapon aufgrund dieser nahen

Verwandschaft der beiden Hydroxylasen auch den oxydativen Arzneimittelabbau in der Leber hemmen könnte, wurde von NETTER et al. (1967) bestätigt; in vitro und in vivo konnten die O-Demethylierung von p-Nitroanisol, die N-Demethylierung von Amidopyrin und die Ringhydroxylierung von Acetanilid mit Metyrapon gehemmt werden. LEIBMAN (1966, 1969) zeigte in gleicher Weise die Hemmung des Hexobarbitalabbaus und einiger anderer Pharmaka durch Metyrapon. Nach einer von SCHENKMAN et al. (1967) entwickelten Methode ließ sich mit Hilfe von Differenzspektren (KAHL et al. 1969, NETTER et al. 1969 und SWEAT et al. 1969) eine Bindung von Metyrapon an das Cytochrom P 450 nachweisen. In Zusammenhang mit den Hinweisen, daß Metyrapon nicht, wie andere Hemmstoffe der mikrosomalen Arzneimittelhydroxylasen, z.B. SKF 525-A, selbst in größerem Ausmaß hydroxyliert wird (KAHL und NETTER 1970), dagegen aber ein an der Ketogruppe reduziertes Metyrapon als Hauptmetabolit von SPRUNT et al. (1967) im menschlichen Urin und von KRAULIS et al. (1968) in verschiedenen tierischen Geweben gefunden wurde, ist es denkbar, daß Metyrapon mit dem Sauerstoff im mikrosomalen Elektronentransportsystem um die reduzierenden Äquivalente konkurriert und dabei selbst reduziert wird. Diese Möglichkeit wird in einer Arbeit von KAHL (1970) diskutiert, der die mikrosomale Metyraponreduktase als NADPH-abhängiges und unter aeroben Bedingungen aktives Enzymsystem mit einer Michaeliskonstante von 1,39 mM charakterisierte. In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß für eine NADPH-abhängige Nitroreduktase die

Abhängigkeit von der mikrosomalen Hydroxylierung nachgewiesen werden konnte (GILLETTE et al. 1968).

Die größte Aktivität der Metyraponreduktase wurde von KAHL (1970) in den Lebermikrosomen gefunden. Untersuchungen über Metyrapon reduzierende Aktivitäten in den Lebermitochondrien stehen jedoch noch aus. Anhaltspunkte für eine solche Möglichkeit bieten Hemmeffekte von Metyrapon an der mitochondrialen Atmungskette (KAHL 1969, ESTABROOK und NETTER 1968) und die bei DEAN und WHITEHOUSE (1967) erwähnte Hemmung einiger NADH-abhängiger Dehydrogenasen in den Mitochondrien und im Zytoplasma.

2) Die Bedeutung der Substratquotienten

Bei Untersuchungen von KAHL und NETTER (1970) an der isoliert perfundierten Rattenleber, wobei hohe Metyraponkonzentrationen (5 mM) zur größeren Metabolitausebeute eingesetzt wurden, zeigte sich im Perfusionsmedium ein Anstieg des Lactat/Pyruvat-Quotienten, der routinemäßig als Kriterium für den physiologischen Zustand dieses "semi-in-vivo-Systems" mitbestimmt wurde, um das Acht.- bis Neunfache. Auf die wichtige Rolle, die Substratquotienten NAD-abhängiger Enzymsysteme, wie z.B. der Lactat/Pyruvat-Quotient, bei der Redoxkompartimentierung der Leberzelle spielen, muß im Folgenden näher eingegangen werden.

Für die Beurteilung des Redoxzustandes in einem Zellkompartiment ist die Kenntnis des Verhältnisses der freien

Pyridinnucleotidkonzentrationen von großer Bedeutung. Eine direkte Messung der freien Pyridinnucleotidkonzentrationen im Lebergewebe ist bisher nicht möglich, weil dabei ein unbekannt großer Anteil gebundener und damit thermodynamisch irrelevanter (HOLZER et al. 1956) Pyridinnucleotide mitbestimmt wird. Es ist das Verdienst von HOLZER et al. (1956) als erste Substratquotienten NAD-abhängiger Enzymsysteme zur Bestimmung des Verhältnisses der freien Pyridinnucleotide herangezogen zu haben. Um dieses Verhältnis für ein bestimmtes Kompartiment aus den Substratquotienten der Leber, bzw. des Perfusionsmediums errechnen zu können, muß das betreffende NAD-abhängige Enzymsystem die folgenden Eigenschaften besitzen (BÜCHER und KLINGENBERG 1958, KLINGENBERG und HÄFEN 1963): 1.) Ausschließliches Vorkommen des Enzyms in einem Kompartiment. 2.) Stellung in einer "Sackgasse" des Stoffwechsels; z.B. Lactat oder β -Hydroxybutyrat können nicht weiter metabolisiert werden, außer über das Enzym über das sie gebildet wurden. Dadurch können sich statische Gleichgewichte zwischen den Substraten und den Pyridinnucleotiden ausbilden, sofern 3.) eine hohe enzymatische Aktivität vorliegt, damit auch bei hohem Substratumsatz das Enzym nicht zum limitierenden Faktor der Reaktion wird. 4.) Gute Permeabilität von Zellmembranen und Blutgefäßen für die Substrate als Voraussetzung repräsentativer Meßwerte in Organgewebe und Extrazellulärraum. Diese vier aufgezählten Qualitäten besitzt das Lactatdehydrogenase-System, dessen Enzym streng auf das Zytoplasma beschränkt ist

(PETTE 1965), wie auch das β -Hydroxybutyratdehydrogenase-System, dessen Enzym ausschließlich in den Mitochondrien vorkommt, wo es fest an die cristae mitochondriales gebunden ist (LEHNINGER et al. 1960). Unter der Voraussetzung des statischen Gleichgewichts der Reaktionsteilnehmer läßt sich mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes aus dem Lactat/Pyruvat-Quotienten, bzw. β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat-Quotienten und deren Gleichgewichtskonstanten das Verhältnis von freiem NAD/freiem NADH für den zytoplasmatischen bzw. den mitochondrialen Raum berechnen:

$$\frac{[\text{Oxydiertes Substrat}]}{[\text{Reduziertes Substrat}]} \cdot K_7 = \frac{[\text{NAD frei}]}{[\text{NADH frei}]}$$

Weil die Wasserstoffionenkonzentration in den Kompartimenten unbekannt ist, wurde ein pH von 7 angenommen (HOLZER et al. 1956, BÜCHER und KLINGENBERG 1958); K_7 ist die Gleichgewichtskonstante des Systems bei pH 7.

3) Zielsetzung der Arbeit

Daraus ergibt sich als erste Zielsetzung dieser Arbeit, mit Hilfe der isoliert perfundierten Rattenleber die Änderungen des Redoxzustandes durch Metyrapon gleichzeitig im Zytoplasma und in den Mitochondrien der Leberzelle anhand der Substratquotienten zu verfolgen, wobei der mitochondriale Raum von besonderem Interesse ist. Als zweite Aufgabe dieser Arbeit lag es nahe den Sauerstoffverbrauch des intakten isolierten Organs unter Metyrapon zu messen, da sich in ei-

ner Arbeit von KAHL und NETTER (1970) an Rattenleberschnitten unter 5 mM Metyrapon, neben einem Anstieg des Lactat/Pyruvat-Quotienten, eine Halbhemmung der Atmung zeigte. Im Vergleich mit Amobarbital (Amytal^R), einem klassischen Inhibitor der Atmungskette, war Metyrapon etwa halb so stark wirksam. Eine Atmungshemmung zeigte sich auch an Rattenlebermitochondrien unter Amobarbital (SCHOLZ et al. 1966) und unter Metyrapon (KAHL und NETTER 1970).

Schließlich sollte die Hemmbarkeit von NAD-abhängigen Dehydrogenasen durch Metyrapon am Beispiel der Lactatdehydrogenase und β -Hydroxybutyratdehydrogenase durch kinetische Versuche in vitro untersucht werden, einmal im Hinblick darauf, daß ein Hemmeffekt ein Anhaltspunkt für einen möglichen Reduktionsort von Metyrapon sein könnte, zum anderen wäre eine Behinderung des Wasserstofftransportes in die Mitochondrien denkbar, falls dem β -Hydroxybutyratdehydrogenase-System als Wasserstoffüberträger zwischen zytoplasmatischen und mitochondrialen Raum eine entscheidende Bedeutung zukäme (DEVLIN und BEDELL 1960, KREBS 1961), was jedoch noch nicht sicher erwiesen ist (LEHNINGER et al. 1960, BORST 1963).

METHODEN

I. Substanzen

Metyrapon als Metopirone^R von der CIBA Pharmaceutical Company, Summit, N. J., U. S. A.

β -Hydroxybutyratdehydrogenase (β -HBDH) aus *Rhodopseudomonas spheroides*, Reinheitsgrad II, spez. Aktivität ca. 3 U/mg; Lactatdehydrogenase (LDH) aus Kaninchenmuskel, ca. 360 U/mg; Malatdehydrogenase (MDH) aus Schweineherz, ca. 1100 U/mg; β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert (NADH) als dinatriumsalz, Reinheitsgrade I und II; β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid, oxydiert (NAD) als freie Säure, Reinheitsgrade I und II, wobei das reinere Coenzympräparat für die kinetischen Versuche, das mit dem geringeren Reinheitsgrad für quantitative Bestimmungen benutzt wurde; "Biochemica-Test-Combination" für Lactat; Pyruvat als kristallines mono-Natriumsalz, und Lactatstandardlösung von C. F. Boehringer & Söhne GmbH Mannheim.

Rinderserumalbumin, trocken, "reinst" von Behringwerke AG, Marburg/Lahn.

Acetessigsäureäthylester "zur Synthese", aus dem frisch Acetoacetat (AA) hergestellt wurde, (s. unter Methoden) von E. Merck, Darmstadt.

β -Hydroxybutyrat (β -HB) wurde als DL (-)- β -Hydroxybutyrat von Serva Entwicklungslabor, Heidelberg bezogen. Daß das verwendete Enzym nur die D-Konfiguration des Substrates umsetzt,

wurde berücksichtigt, indem jeweils die doppelte Menge des Razemats eingesetzt wurde.

II. Versuche an der isoliert perfundierten Rattenleber

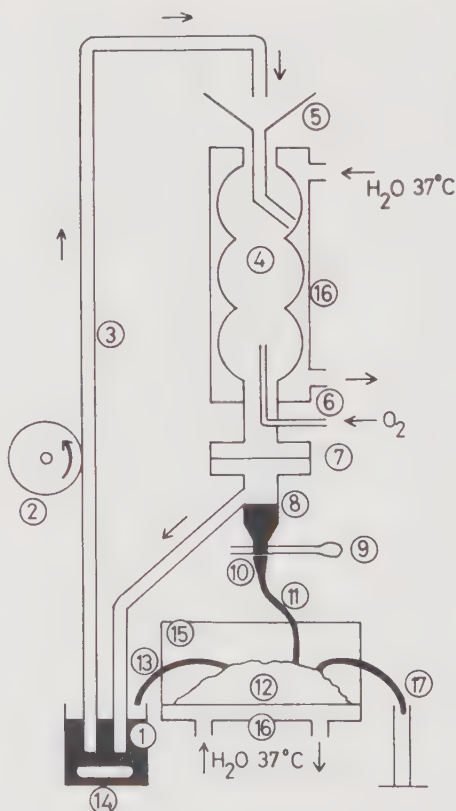
1) Apparatur

Allgemeines. Als Methode ist die isoliert perfundierte Leber bereits ein Jahrhundert alt (LUCHSINGER 1875). Zur Standardmethode wurde sie in den letzten zwanzig Jahren von den Arbeitskreisen um MILLER (1951, 1954, 1960) und BRAUER (1951) entwickelt. Das Wesentlichste über die Thematik und methodische Verbesserungen wird in den Arbeiten von SCHIMASSEK (1962, 1963) und MEIERS et al. (1966) gesagt.

Die hier verwendete Apparatur entsprach im Prinzip der von MILLER et al. (1951) angegebenen Perfusionsvorrichtung. Als wichtigste Unterschiede seien der Ersatz der Ventilpumpe durch eine Rollpumpe, der Wegfall des Wärmekastens und das Belassen der Leber in situ (s. HEMS et al. 1966) genannt. Wie Abbildung 2 zeigt, wird das Perfusionsmedium aus dem Reservebehälter (1) von der Rollpumpe (2) durch ein Glasrohr (3) in den Oxygenator (4) befördert. Um eine gleichmäßige Benetzung der Oxygenatorwand zu erreichen, ist ein langsam rotierendes Zwischenstück (5) vorgeschaltet. Der so entstehende Flüssigkeitsfilm wird mit einem vorgewärmten und angefeuchteten Gemisch aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxyd im Gegenstrom begast. (6). Weitere Stationen nach der

der Oxygenatorpassage sind: Ein Filter (7), ein Überlaufgefäß, dessen Pegel (8) zwanzig Zentimeter über der Rattenleber liegt, ein Gummischlauch mit Klemme (9), ein sich verjüngendes Zwischenstück (10), auf das der Pfortaderkatheter (11) gesteckt ist, die in situ belassene Rattenleber, der vena-cava-Katheter

(13) und wieder der Reservebehälter. Die Leber befindet sich in einer feuchten Kammer (15). Die Temperatur der Kammer und des Oxygenators wird durch einen Warmwassermantel (16) auf konstant 37°C gehalten. Das Gallesekret wird durch den Gallekatheter (17) in ein graduiertes Gefäß abgeleitet.



2). Perfusionsmedium

Das halbsynthetische Medium von SCHIMASSEK (1962) erwies sich in vielerlei Hinsicht dem verdünnten Rattenblut von MILLER et al. (1951) überlegen. Für Versuche am hiesigen Institut bewährte sich folgende Modifikation des von SCHIMASSEK (1962) angegebenen Perfusionsmediums:

Das pro Perfusion eingesetzte Volumen von 100 ml bestand aus 60 Teilen einer Krebs-Ringer-Bicarbonatlösung mit einem pH von 7,6 und aus 40 Teilen Rindererythrozyten. Außerdem enthielt diese Suspension 1,5 g% Rinderserumalbumin als kolloidosmotischen Anteil und 0,4 g% Glucose. Antibiotica wurden nicht zugesetzt. Bei Begasen mit Carbogen stellte sich der pH-Wert des Perfusionsmediums auf 7,4 ein. Metyrapon wurde nach 30-minütigen Vorlauf zugesetzt. (s. unter "Perfusion") und lag dann in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-3}$ M vor. Das Rinderblut wurde im Schlachthof mit folgender Citrat-Citronensäure-Glucosemischung im Verhältnis 1:1 aufgefangen: 20,5 g Glucose; 9,65 g Natriumcitrat x 5,5 H₂O; 1,5 g Citronensäure; 4,2 g NaCl; aqua dest. ad 1000 ml. Das bei 4°C aufbewahrte Citratblut wurde nicht länger als zwei Tage verwendet. Die Erythrozyten wurden abzentrifugiert und dreimal mit einer einprozentigen NaCl-Lösung gewaschen.

3) Präparat

250-350g schweremännliche Sprague-Dawley Ratten, die standardisiertes Laborfutter (Altromin^R) und Wasser ad libitum erhielten, wurden mit Urethan (1,2 g/kg i.p.) narkotisiert und mit Vetren^R (10 mg/kg i.v.) heparinisiert.

Auf dem - aus der Perfusionsvorrichtung herausgenommenen - Boden der feuchten Kammer wurde wie folgt operiert:

Darstellung des Pfortadergebietes durch breite Laparatomie mit Längs.- und Querschnitt und Abdrängen des Darmkonvoluts nach rechts. Danach Stauung des Gallenganges durch duodenumnahe Ligatur und Anschlingen des leberhilusnahen Teils.

Eröffnung des Gallengangs durch einen kleinen Einschnitt und Einschieben des Gallengangkatheters (PVC, Außendurchmesser 1,0 mm, lichte Weite 0,5 mm). Fixierung durch Zuziehen und Knoten der leberhilusnahen Schlinge über dem Schlauch. Anschließend lockeres Anschlingen der arteria hepatica und der vena cava inferior abdominalis zwischen dem Abgang der Nierenvenen und der Leber. Dann doppeltes Anschlingen der Pfortader. Einlegen und Fixieren des Pfortaderkatheters (PVC, Außendurchmesser 2,1 mm, lichte Weite 1,5 mm) in gleicher Weise wie beim Gallengang.

Um Luftembolien zu vermeiden, war der Pfortaderkatheter mit Krebs-Ringerlösung gefüllt und an einem Ende mit einer Klemme verschlossen.

Sobald der Pfortaderkatheter eingebunden war, wurden die übrigen Ligaturen rasch und kräftig zugezogen und geknotet. Die Zeit der Leberanoxie wurde registriert.

Darauf Entfernung der vorderen Brustkorbwand durch drei Schnitte. Einlegen des vena-cava-Katheters (PVC, Maße wie Pfortaderkatheter) durch einen Einschnitt in den rechten Vorhof des Herzens. Durchtrennen der die vena cava inferior thoracis begleitenden Nervenstämme und entsprechende Fixierung des Katheters. Danach wurde die Leber samt Tierleiche und Unterlage in die Perfusionsapparatur eingebracht und der Pfortaderkatheter blasenfrei angeschlossen. Das in der Leber verbliebene Rattenblut wurde mit Krebs-Ringerlösung ausgewaschen. Danach wurde die Apparatur auf das Perfusionsmedium umgestellt. Die Zeit vom ersten Schnitt bis zur endgültigen Perfusion betrug durchschnittlich 17 Minuten, davon entfielen 5,4 Minuten auf die Leberanoxie.

4) Perfusion

Der Perfusionsapparat wurde zunächst mit einer zweiprozentigen Formalinlösung desinfiziert, die dann gründlich mit destilliertem Wasser ausgewaschen wurde. Darauf folgte eine Krebs-Ringer-Bicarbonatlösung, mit der die Apparatur rezirkulierend in Wartestellung lief. Nach Anschluß des Präparates wurde ein Teil dieser Lösung zur Entfernung des Restblutes aus der Leber benutzt. Die Umschaltung von der Elektrolytlösung auf das Perfusionsmedium geschah durch Austauschen der Reservebehälter. Zuvor wurden 4 ml vom Perfusionsmedium als Leerwert für die Metabolitbestimmungen abpipetiert. Alle weiteren Proben wurden in Abständen von

30 Minuten aus dem vena-cava-Katheter entnommen. Die Metyraponzugabe (114 mg in 8 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatlösung, bzw. 8 ml dieser Lösung ohne Metyrapon bei den Kontrollversuchen) erfolgte nach Entnahme des 30-Minutenwertes durch Einmischen in den Reservebehälter. Die Leberfunktion wurde alle 30 Min. anhand von Leberdurchfluß, Gallesekretion und retrospektiv durch Bestimmung des Lactat/Pyruvat-Quotienten überprüft. Die Durchflußgeschwindigkeit lag im Mittel mit 1,5 ml/min und Gramm Leberfeuchtgewicht in der Norm (SCHIMASSEK 1963 a) und unterschritt in keinem Fall 0,8 ml/min und Gramm. Der Gallefluß der Kontrollperfusion befand sich mit 1 ml pro Leber nach 3 Stunden Perfusion im Normbereich (MEIERS et al. 1966); bei den Perfusionen mit Metyrapon war er allerdings nur halb so groß. Der Lactat/Pyruvat-Quotient konnte als Funktionskriterium von vornherein nur für Perfusionen ohne Metyrapon herangezogen werden, da er sich unter Metyrapon stark ändert (KAHL und NETTER 1970). Bei den Perfusionen ohne Metyraponzusatz lag der Quotient mit Werten zwischen 7 und 10 im Normbereich (SCHIMASSEK 1963 b).

5) Bestimmung der Substratkonzentrationen

Sofort nach Entnahme wurden die Proben zur Enteiweißung mit eiskalter Perchlorsäure (0,7 M) zu gleichen Teilen gemischt. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand tiefgefroren. Am nächsten Tag wurden die Substrate darin enzymatisch nach der Endwertmethode bestimmt. Gemessen wurde die Zu.- bzw. Abnahme des reduzierten Pyridinnucleotids NADH am Photo-

meter "Eppendorf" in Glasküvetten von 1 cm Lichtweg bei konstant 25°C und 366 nm.

Lactat wurde mit der Testkombination der Firma Boehringer/Mannheim bestimmt. Pyruvat wurde im Bestimmungsansatz für Acetoacetat kumulativ mitgemessen. Dieser Ansatz stellte, ebenso wie der β -Hydroxybutyratansatz, die Modifikation einer Arbeitsvorschrift der Firma Boehringer/Mannheim dar. Die Zusammensetzung der Ansätze ist tabellarisch im Anhang wiedergegeben.

Für alle vier Substrate wurden Eichkurven angelegt, indem bekannte Substratmengen in den enteiweißten Überstand gegeben wurden. Da Acetoacetat nicht stabil ist, wurde es frisch aus dem redestillierten Äthylester durch Verseifung mit Natronlauge nach LJUNGGREN (1924) in einer einmolaren Lösung (SALWAY 1969) hergestellt. Anhand der Eichkurven wurden die Substratkonzentrationen aus den Extinktionsdifferenzen im enteiweißten Überstand bestimmt und auf die Konzentration im Perfusionsmedium rückgerechnet. Für die Substratkonzentrationen wurde dabei eine Gleichverteilung in Sediment und enteiweißten Überstand angenommen, was aufgrund ihres guten Diffusionsvermögens sehr wahrscheinlich ist. Die noch in den Bestimmungsansätzen vorhandene Metyraponkonzentration störte die Methode nicht.

6) Sauerstoffmessungen

Der Sauerstoffdruck wurde polarographisch mit den apparativen Ausrüstungen der Firmen Eschweiler und Beckman Instruments bestimmt. Zur Messung des Partialdrucks wurde das aus der Leber ausströmende "Blut" an einer temperierten Elektrode vorbeigeführt, wodurch sich die Veränderungen des venösen pO_2 kontinuierlich registrieren ließen. Die Konstanz des arteriellen pO_2 zur Zeit der Veränderung des venösen pO_2 wurde durch punktuelle Messung von arteriellen Proben, mit Hilfe des physiologischen Gasanalysators Modell 160 der Firma Beckman Instruments, ebenfalls polarographisch bestimmt.

Zur Ermittlung des Sauerstoffverbrauchs des isolierten Organs wurde der Sauerstoff aus gleichzeitig entnommenen arteriellen und venösen Proben von 25 bis 50 μ l in einem geschlossenen Meßgefäß, in dem sich eine saure saponinhal- tige Ferricyanidlösung befand, aus der Hämoglobinbindung freigesetzt und dabei erfolgende Anstieg des pO_2 mit einer Mehrdrahtelektrode der Firma Eschweiler & Co gemessen. Aus dem Durchflußvolumen der Leber zum Zeitpunkt der Proben- entnahmen und der arterio-venösen Differenz des Sauerstoff- gehaltes im Blut, wurde die Atmungsgröße des isolierten Or- gans errechnet. Bezogen wurde auf g Feuchtgewicht der Leber am Ende des Versuches.

Die Eichung bei den polarographischen Messungen erfolgte mit drei Eichgasen unter Berücksichtigung der täglichen Schwankungen des atmosphärischen Luftdrucks.

7) Statistische Auswertung

Aus den Substratkonzentrationen, die zum gleichen Zeitpunkt im Perfusionsverlauf bestimmt worden waren, wurden (für 6 Perfusionen mit Metyrapon und 3 Perfusionen ohne Metyrapon) der Mittelwert, die einfache Standardabweichung und der mittlere Fehler des Mittelwertes gebildet. In den Abbildungen und im Text werden nur Mittelwert und Standardabweichung aufgeführt. Die Werte mit und ohne Metyrapon für den gleichen Zeitpunkt im Perfusionsverlauf wurden im t-Test für unverbundene Stichproben miteinander verglichen. Unterschiede wurden als signifikant bezeichnet, wenn nach einer Tabelle der Student-Verteilung (in "Wissenschaftliche Tabellen", 7. Auflage, S. 32, der Firma GEIGY, Basel) die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als $2P = 0,05$ war. Bei großen Varianzunterschieden zwischen beiden Gruppen wurde der Behrens-Fisher-Test angewendet.

III. Versuche zur Hemmung der Lactatdehydrogenase und der β -Hydroxybutyratdehydrogenase in vitro

Es wurden die Reaktionsrichtungen Pyruvat nach Lactat und β -Hydroxybutyrat nach Acetoacetat untersucht. Dabei wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der Zu.- bzw. Abnahme der Extinktion des reduzierten Pyridinnucleotids NADH am Photometer "Eppendorf" bei 366 nm und konstant 25°C in Glasküvetten von 1 cm Lichtweg gemessen.

Nach dem Start der Reaktion durch das Enzym wurden die Extinktionswerte alle 15 Sekunden abgelesen. Für die Anfangsgeschwindigkeit wurden nur die Werte der ersten Minute herangezogen, in der die Geschwindigkeit konstant blieb. Die Zusammensetzungen der Ansätze sind bei den Abbildungen wiedergegeben.

ERGEBNISSE

I. Versuche an der isoliert perfundierten Rattenleber

a) Substratkonzentrationen und ihre Quotienten

1) Lactat (Abb.3)

Perfusionen ohne Metyrapon:

Im Perfusionsmedium lag bereits vor Leberkontakt eine Lactatkonzentration von durchschnittlich $0,76 \pm 0,17$ mM vor, die von der Diffusion aus den Erythrozyten herrührte. Nach 30 min Perfusionszeit stellte sich ein Gleichgewicht bei $2,20 \pm 0,85$ mM ein, das eine Stunde lang konstant blieb, um dann leicht abzusinken.

Perfusion mit Metyrapon:

Nach gemeinsamer Anfangsstrecke mit den Kontrollen, kam es nach Inhibitorzugabe zu einem steilen Anstieg der Lactatkonzentration, der nach einer Stunde einen Gipfel mit $8,65 \pm 2,30$ mM erreichte und danach wieder abfiel. Die 60-, 90- und 150-Minutenwerte unterschieden sich signifikant von den Kontrollen.

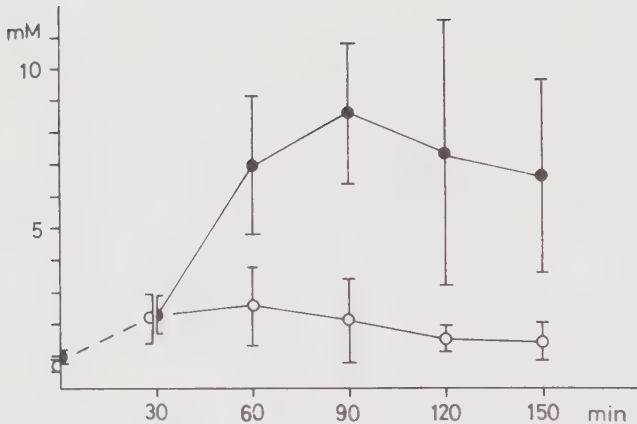


Abb.3 Anstieg der Lactatkonzentration im Perfusionsmedium nach Metiraponzugabe
Abszisse:Perfusionszeit in Minuten.Ordinate:Lactatkonzentration (mM)
Zeichenerklärung:Schwarze Kreise:5 mM Metirapone im Perfusionsmedium (6 Versuche).Weiße Kreise:Kontroll-perfusion ohne Metiraponzusatz (3 Versuche).
Die Zugabe von Metirapone,bzw. des Lösungsmittels ohne Metirapone bei den Kontrollversuchen,erfolgte zum Zeitpunkt "30 Minuten".

2) Pyruvat (Abb.4)

Perfusionen ohne Metyrapon:

Die Pyruvatkonzentration im Perfusionsmedium vor Leberkontakt lag mit 0,02 mM bei der Empfindlichkeit der verwandten Methode zu niedrig für eine quantitative Aussage. Der höchste Wert zeigte sich nach 30 min mit $0,34 \pm 0,09$ mM. Im weiteren Perfusionsverlauf verminderte sich dieser Wert auf die Hälfte.

Perfusionen mit Metyrapon:

Mit Ausnahme des 60-Minutenwertes deckte sich der Verlauf mit den Kontrollen beinahe vollständig. Das augenscheinlich stärkere Absinken der Pyruvatkonzentration nach Metyraponzugabe ließ sich aber nicht statistisch sichern.

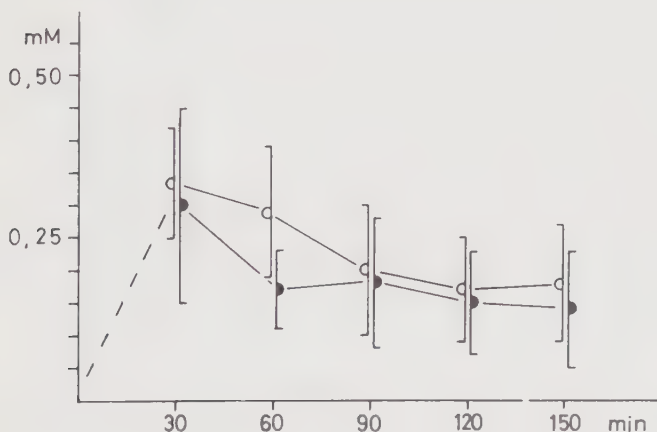


Abb.4 Pyruvatkonzentrationen im Perfusionsmedium nach Metyraponzugabe
Abszisse:Perfusionszeit in Minuten.Ordinate:Pyruvatkonzentration (mM)
Zeichenerklärung siehe Legende zu Abb.3

3) Lactat/Pyruvat-Quotient (Abb.5)

Perfusionen ohne Metyrapon:

Im Perfusionsmedium vor Leberkontakt erschien eine Ausrechnung des Lactat/Pyruvat-Quotienten wegen des sehr kleinen und damit ungenauen Pyruvatwertes nicht mehr sinnvoll. Im Übrigen bewegten sich die Lactat/Pyruvat-Quotienten der durchströmten Leber im Mittel zwischen 7 und 10 .

Perfusionen mit Metyrapon:

Nach Metyraponzugabe stieg der Lactat/Pyruvat-Quotient rasch an. Er erreichte seinen höchsten Mittelwert mit $56,45 \pm 28,22$ eine Stunde nach Inhibitorzugabe und fiel danach nur wenig ab. Der höchste Einzelwert lag bei 101,9 und der niedrigste bei 26,5 . Im Vergleich der Mittelwerte mit denen der Kontrolle ergab sich eine Erhöhung des Lactat/Pyruvat-Quotienten um das Fünf.- bis Sechsfache. Alle Werte nach Metyraponzugabe unterschieden sich signifikant von den Kontrollwerten.

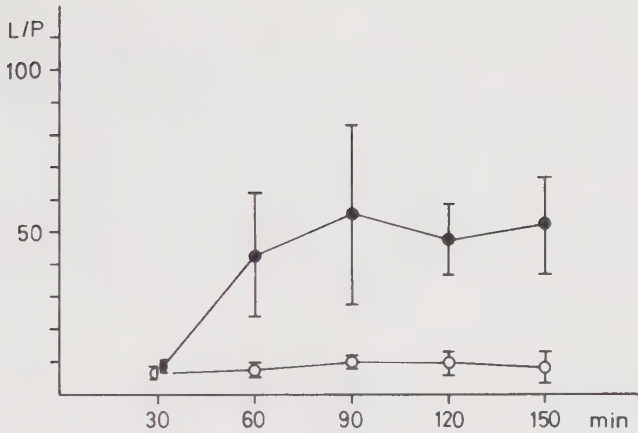


Abb.5 Anstieg der Lactat/Pyruvat-Quotienten im Perfusionsmedium nach Metiraponezugabe
Abszisse: Perfusionszeit in Minuten. Ordinate: Lactat/Pyruvat-Quotient.
Zeichenerklärung siehe Legende zu Abb.3

4) β -Hydroxybutyrat (Abb.6)

Perfusionen ohne Metirapone:

Vor dem Beginn der Durchströmung waren die Konzentrationen von β -Hydroxybutyrat und Acetoacetat im Perfusionsmedium ausserordentlich niedrig und betrugen nur wenige Nanomol pro Milliliter. Nach dreißigminütigem Vorlauf fand sich eine β -Hydroxybutyratkonzentration von $0,16 \pm 0,07$ mM, die im weiteren Perfusionsverlauf allmählich auf $0,42 \pm 0,19$ mM anstieg.

Perfusionen mit Metyrapon:

Von einem den Kontrollen praktisch gleichen Ausgangswert aus, stieg die β -Hydroxybutyratkonzentration nach Inhibitorzugabe geradlinig an. Sie erreichte 90 min nach Metyraponzugabe ihren höchsten Punkt mit $1,84 \pm 0,85$ mM und nahm dann geringfügig ab. Die 90- bis 150-Minutenwerte unterschieden sich signifikant von den Kontrollen.

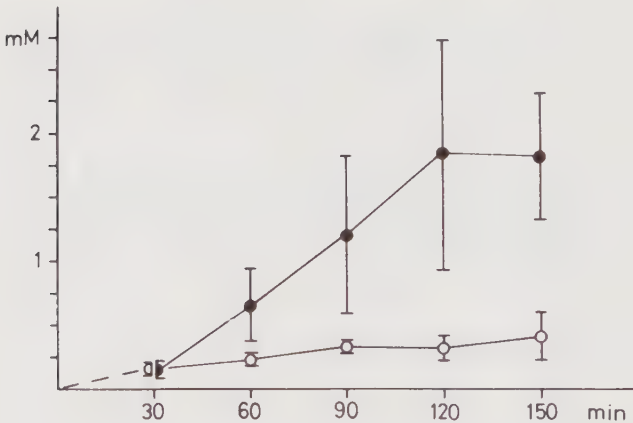


Abb.6 Einfluß von Metyrapon auf die β -Hydroxybutyratkonzentration im Perfusionsmedium
Abszisse: Perfusionszeit in Minuten. Ordinate: β -Hydroxybutyratkonzentration (mM)
Zeichenerklärung siehe Legende zu Abb.3

5) Acetoacetat (Abb.7)

Perfusionen ohne Metyrapon:

Die Acetoacetatkonzentration nahm während des Perfusionsverlaufs im selben Verhältnis zu, wie die β -Hydroxybutyratkonzentration unter den gleichen Bedingungen.

Sie stieg vom 30-Minutenwert bis zum Ende der Perfusion kontinuierlich von $0,20 \pm 0,06$ mM auf $0,48 \pm 0,10$ mM an.

Perfusionen mit Metyrapon:

Im Gegensatz zu den Kontrollen, die vom 30-Minutenwert an ausnahmslos weiter anstiegen, zeigte sich bei allen Perfusionen nach Metyraponzugabe ein initialer Konzentrationsabfall.

Innerhalb von 30 min fiel die Konzentration von $0,24 \pm 0,13$ mM auf $0,13 \pm 0,05$ mM fast um die Hälfte ab. Die 60-Minutenwerte unterschieden sich signifikant von den Kontrollen. Im weiteren Perfusionsverlauf verschwand der Unterschied; vom 120-Minutenwert an stimmten die Substratkonzentrationen mit den Kontrollen bereits wieder überein.

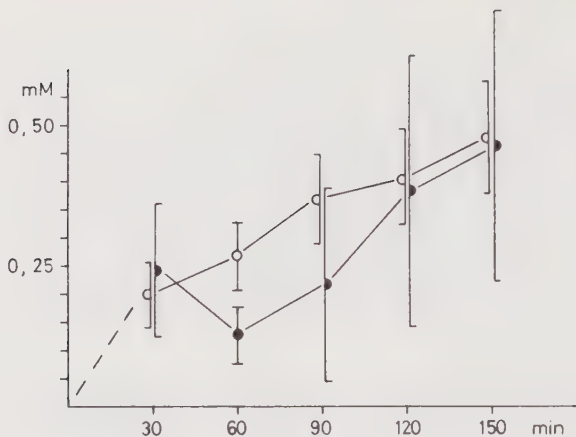


Abb.7 Acetoacetatkonzentration im Perfusionsmedium nach Metyraponzugabe
Abszisse:Perfusionszeit in Minuten.Ordinate:Acetoacetatkonzentration (mM).
Zeichenerklärung siehe Legende zu Abb.3

6) β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat-Quotienten (Abb.8)

Perfusionen ohne Metyrapon:

Ähnlich wie beim Lactat/Pyruvat-Quotienten, war die Ausrechnung des β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat-Quotienten im Perfusionsmedium vor Leberkontakt wegen der kaum noch meßbaren Substratkonzentrationen nicht mehr sinnvoll. Nach 30 min. Vorlauf lag der Quotient bei $0,84 \pm 0,40$ und blieb während der Perfusion konstant bei einem Wert um $0,9$. Der höchste Einzelwert betrug $1,28$, der niedrigste $0,51$.

Perfusionen mit Metyrapon:

Nach Inhibitorzugabe kam es zu einem steilen Anstieg, der nach einer Stunde ein Maximum mit $6,26 \pm 2,73$ aufwies und danach wieder abfiel. Der höchste Einzelwert lag bei 10,0, der niedrigste bei 2,49. Die Quotienten erhöhten sich im Mittel um das Fünf.- bis Sechsfache; sie unterschieden sich signifikant von den Kontrollen.

Der Anstieg der Quotienten in der ersten Stunde nach Metyraponzugabe ging nicht nur auf die Zunahme der Konzentration von β -Hydroxybutyrat, sondern im gleichen Maße auf die initiale Konzentrationsabnahme von Acetoacetat (Abb. 7) zurück. Vom 120-Minutenwert an wurden die hohen Quotienten jedoch allein durch die Konzentration von β -Hydroxybutyrat verursacht, da sich die Acetoacetatkonzentration in diesem Zeitraum nicht mehr von den Kontrollen unterschied.

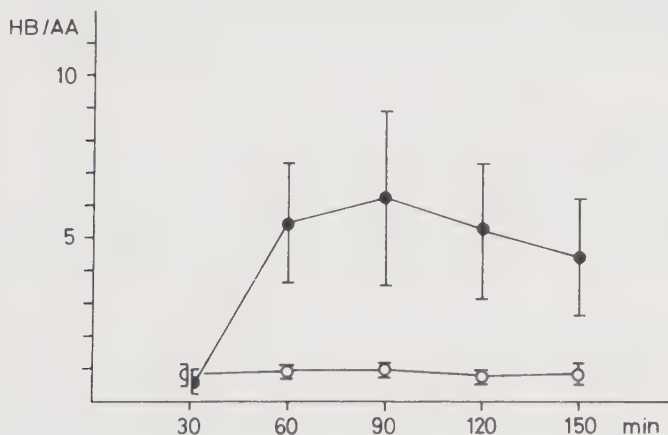


Abb. 8 Verhalten des β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat-Quotienten nach Metyraponzugabe
Abszisse: Perfusionszeit in Minuten. Ordinate: β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat-Quotient.

7) Substratkonzentrationen und Quotienten innerhalb der ersten 20 Minuten nach Metyraponzugabe (Abb.9)

In einem orientierenden Versuch wurden die Substratkonzentrationen und ihre Quotienten 10 und 20 Minuten nach Metyraponzugabe (5 mM) bestimmt. Die Werte sind in Abb.9 zusammengefaßt. Die Konzentration ist in mM, die Zeit in Minuten nach Metyraponzugabe angegeben.

t	L	P	L/P	β -HB	AA	β -HB/AA
0	3,2	0,29	10,9	0,17	0,27	0,64
10	5,4	0,17	31,8	0,34	0,19	1,84
20	7,8	0,13	60,0	0,50	0,21	2,34

Abb.9 Erklärung siehe Text.

Nach 10 Minuten war in diesem Einzelversuch bereits eine deutliche Reaktion auf den Inhibitor festzustellen.

b) Sauerstoffmessungen

1) Sauerstoffverbrauch

Bei der Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs ergaben sich bei drei Perfusionen folgende Werte (Abb.10):

	vor Metyraponzugabe				nach Metyraponzugabe		
t(min)	60	30	5	0	20	40	60
$\bar{X}$	389,6	383,6	407,6		186,0	153,6	136,4
s	$\pm 40,2$	$\pm 118,0$	$\pm 84,0$		$\pm 75,2$	$\pm 20,4$	$\pm 10,9$

Abb.10 Sauerstoffverbrauch der isoliert perfundierten Rattenleber vor und nach Metyraponzugabe
Der Sauerstoffverbrauch, der zu verschiedenen Zeitpunkten (in Minuten) vor und nach Metyraponzugabe gemessen wurde, ist in $\mu\text{Atom Sauerstoff/Stunde und Gramm Leberfeuchtgewicht}$ angegeben. Zum Zeitpunkt "Null" wurde Metyrapon in einer Endkonzentration von 5 mM zugesetzt. Die aufgeführten Mittelwerte enthalten die Ergebnisse aus 3 Leberperfusionen.

Wie die Abbildung zeigt, sank der Sauerstoffverbrauch von einem Ruhewert von durchschnittlich 390 $\mu\text{A Sauerstoff pro Stunde und Gramm Leberfeuchtgewicht}$ nach Inhibitorzugabe auf ungefähr die Hälfte ab.

2) Kontinuierliche Messung des Sauerstoffpartialdruckes

Bei der kontinuierlichen Verfolgung des Sauerstoffpartialdruckes im ausfließenden Leberblut, zeigte sich nach einer Latenzperiode von durchschnittlich drei Minuten, die der

Hemmstoff brauchte, um von dem Reservebehälter in die Leber zu gelangen, ein Anstieg des Sauerstoffpartialdruckes, der nach 10 Minuten ein Plateau erreichte, das über eine Stunde unverändert bestehen blieb. In Abb. 11 ist eine Originalkurve wiedergegeben, die repräsentativ für sieben weitere Versuche ist.

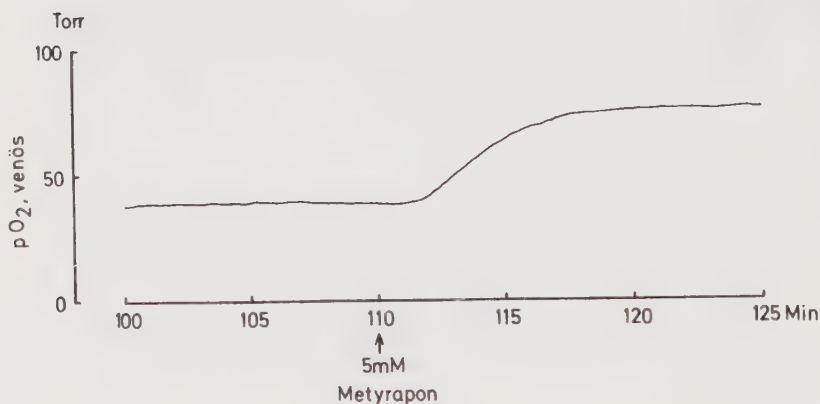


Abb. 11 Anstieg des venösen Sauerstoffpartialdruckes nach Metyraponzugabe
Abszisse: Perfusionszeit in Minuten. Die Metyraponzugabe (5mM) im Perfusionsverlauf ist durch einen Pfeil markiert. Ordinate: Sauerstoffpartialdruck in Torr.

II. Versuche zur Hemmung der Lactatdehydrogenase und der β -Hydroxybutyratdehydrogenase in vitro

a) Lactatdehydrogenase

1) Substratabhängige Kinetik

Abb.12 zeigt die substratabhängige Kinetik der Reaktionsrichtung Pyruvat nach Lactat mit und ohne Metyrapon in einer Lineweaver-Burk-Darstellung (LINEWEAVER und BURK 1934). Die Werte mit Metyrapon liegen auf der gleichen Geraden, wie diejenigen ohne Hemmstoff. Aus der Darstellung läßt sich eine Michaeliskonstante der Lactatdehydrogenase für Pyruvat von $2,3 \cdot 10^{-4}$ M bestimmen.

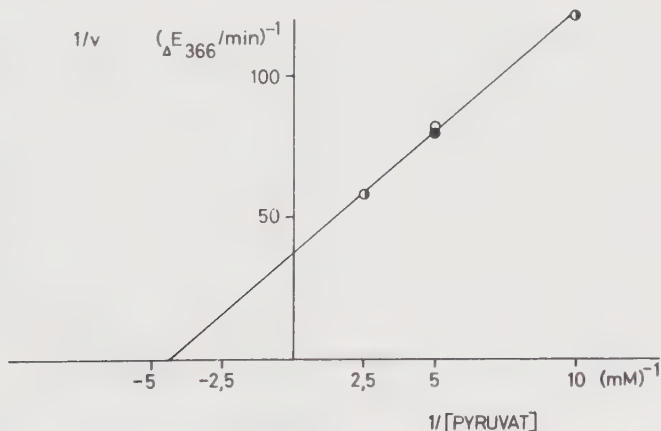


Abb.12 Lineweaver-Burk-Darstellung der Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit (reziprok auf der Ordinate) von der Substratkonzentration (reziprok auf der Abszisse) bei konstanter Coenzymkonzentration.

Schwarze Kreise: Ansätze mit Metyrapon $5 \cdot 10^{-3}$ M.
Weiße Kreise: Ansätze ohne Metyrapon. In 2,06 ml
Phosphatpuffer nach Sørensen pH 7,4 waren weiter
gelöst: Pyruvat 10^{-3} ; $2 \cdot 10^{-3}$; $4 \cdot 10^{-3}$ M.
NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M. LDH 0,018 mg/l (1 mg = 360 U).
Jeder Punkt stellt den Mittelwert aus drei Einzel-
versuchen dar. Einzelwerte siehe Tabellen im Anhang.

2) Coenzymabhängige Kinetik

In Abbildung 13 ist, analog zu Abbildung 12, die coenzymabhängige Kinetik wiedergegeben. Auch hier war keine Hemmung durch Metyrapon festzustellen. Aus der Darstellung läßt sich eine Michaeliskonstante der Lactatdehydrogenase für NADH von $1,3 \cdot 10^{-5}$ M bestimmen.

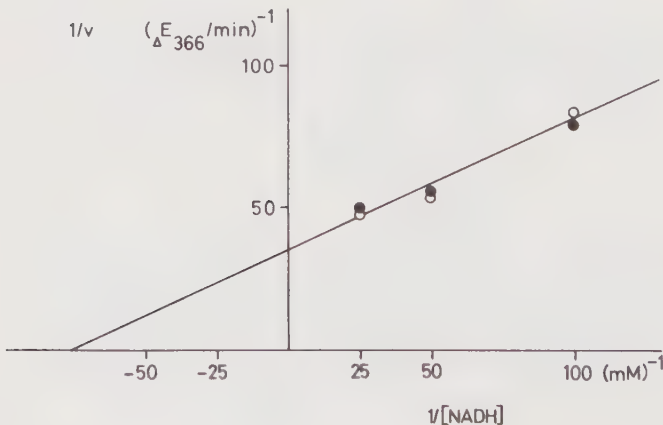


Abb. 13 Legende siehe nächste Seite

Abb.13 Lineweaver-Burk-Darstellung der Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit (reziprok auf der Ordinate) von der Coenzymkonzentration (reziprok auf der Abszisse) bei konstanter Substratkonzentration.
Schwarze Kreise: Ansätze mit Metyrapon $5 \cdot 10^{-3}$ M.
Weiße Kreise: Ansätze ohne Metyrapon. In 2,06 ml Phosphatpuffer nach Sørensen pH 7,4 waren weiter gelöst:
NADH 10^{-4} ; $2 \cdot 10^{-4}$; $4 \cdot 10^{-4}$ M. Pyruvat $3 \cdot 10^{-3}$ M.
Lactatdehydrogenase 0,018 mg/l (1mg = 360 U).
Jeder Punkt stellt den Mittelwert aus drei Einzelversuchen dar. Einzelwerte siehe Tabellen im Anhang.

b) β -Hydroxybutyratdehydrogenase

1) Substratabhängige Kinetik (Abb.14)

Abb.14 zeigt die substratanhängige Kinetik der Reaktionsrichtung β -Hydroxybutyrat nach Acetoacetat bei verschiedenen Metyraponkonzentrationen in einer Dixon-Darstellung (DIXON 1953). Aus der Abbildung geht hervor, daß die Anfangsgeschwindigkeit für die verschiedenen Substratkonzentrationen nur geringfügig mit steigenden Metyraponkonzentrationen abnahm. Die Inhibitorkonstante von $5 \cdot 10^{-2}$ M fiel entsprechend hoch aus. Aus den metyraponfreien Werten läßt sich eine Michaeliskonstante der β -Hydroxybutyratdehydrogenase für β -Hydroxybutyrat von $5,5 \cdot 10^{-4}$ M ermitteln.

Abb.14 siehe nächste Seite

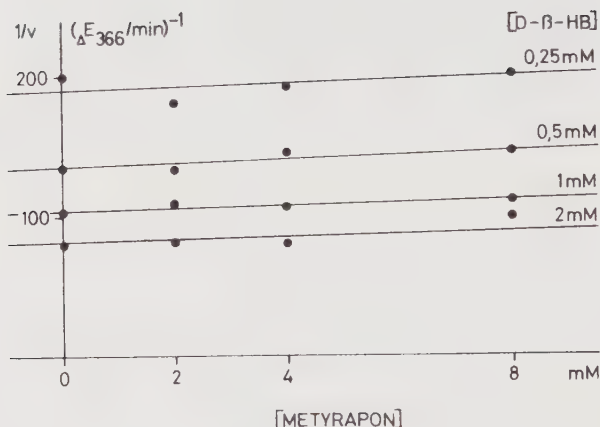


Abb. 14 Dixon-Darstellung der Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit (reziprok auf der Ordinate) bei verschiedenen Substratkonzentrationen (eingezeichnete Geraden) von verschiedenen Metyraponkonzentrationen (auf der Abszisse) bei konstanter Coenzymkonzentration. In 2,205 ml Phosphatpuffer nach Sørensen pH 7,4 waren gelöst: Metyrapon 0 ; $2 \cdot 10^{-3}$; $4 \cdot 10^{-3}$; $8 \cdot 10^{-3}$ M. β -Hydroxybutyrat $0,25 \cdot 10^{-3}$; $0,5 \cdot 10^{-3}$; 10^{-3} ; $2 \cdot 10^{-3}$ M. NAD $2 \cdot 10^{-3}$ M. β -Hydroxybutyratdehydrogenase 1,13 mg/l (1 mg = 3 U).

2) Coenzymabhängige Kinetik (Abb. 15)

In Abbildung 15 ist, analog zu Abbildung 14, die coenzymabhängige Kinetik wiedergegeben. Was über die substratabhängige Kinetik vorher gesagt wurde, gilt prinzipiell auch hier. Die Inhibitorkonstante liegt ebenfalls bei etwa $5 \cdot 10^{-2}$ M.

Aus den metyraponfreien Werten läßt sich eine Michaelis-konstante der β -Hydroxybutyratdehydrogenase für das Coenzym von $6,25 \cdot 10^{-5}$ M ermitteln.

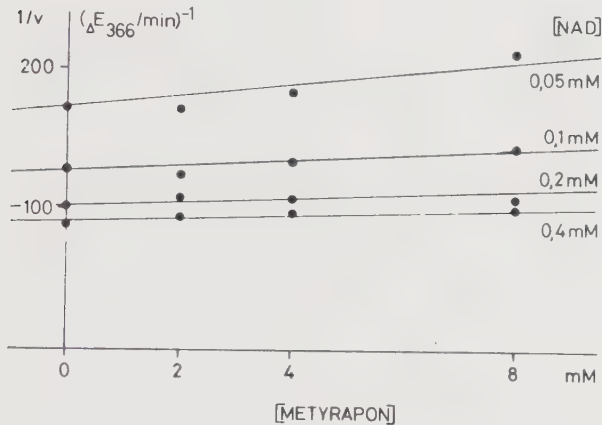


Abb.15 Dixon-Darstellung der Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit (reziprok auf der Ordinate) bei verschiedenen Coenzymkonzentrationen (eingezeichnete Geraden) von verschiedenen Metyraponkonzentrationen (auf der Abszisse) bei konstanter Substratkonzentration. In 2,205 ml Phosphatpuffer nach Sørensen pH 7,4 waren gelöst: Metyrapon 0 ; $2 \cdot 10^{-3}$; $4 \cdot 10^{-3}$; $8 \cdot 10^{-3}$ M. NAD $0,5 \cdot 10^{-4}$; 10^{-4} ; $2 \cdot 10^{-4}$ M. β -Hydroxybutyrat $4 \cdot 10^{-3}$ M. β -Hydroxybutyratdehydrogenase $1,13$ mg/l (1 mg = 3 U).

DISKUSSION

1) Änderungen des intrazellulären Redoxzustandes der isoliert perfundierten Rattenleber durch Metyrapon

Die im Perfusionsmedium gemessenen Quotienten Lactat/Pyruvat und β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat stellen, wie in der Einleitung näher ausgeführt wurde, ein direktes Maß für den Redoxzustand der freien Pyridinnucleotide im zytoplasmatischen, bzw. mitochondrialen Raum der Leberzelle dar. Die Quotienten werden im ungestörten System von der isoliert perfundierten Rattenleber im physiologischen Bereich konstant gehalten. Künstlich im Perfusionsmedium erhöhte Quotienten durch Lactat- (SCHIMASSEK 1963 b), bzw. β -Hydroxybutyratinfusion (KREBS et al. 1969), werden von der Leber wieder auf den Ausgangswert einreguliert. Eine Erhöhung bei der Quotienten um das Zwei.- bis Dreifache wird bei intensivem Fettsäurekatabolismus der Leber beobachtet, z.B. im Hungerzustand (WILLIAMSON et al. 1967, FORSANDER et al. 1965), bei Diabetes mellitus und bei Fettsäureinfusion (KREBS et al. 1969). Eine noch stärkere Erhöhung zeigt sich in der Anoxie (SCHIMASSEK 1963 a, SCHOLZ 1968), oder nach Blockade der mitochondrialen Atmungskette z.B. durch Amytal^R (SCHOLZ et al. 1966).

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, blieb der Lactat/Pyruvat-Quotient bei Versuchen ohne Metyraponzusatz mit Werten zwischen 7 und 10 über die Perfusionszeit konstant. Werte um 10 wurden für das Rattenlebergewe-

be in vivo (HOHORST et al.1959),und im Gewebe der isoliert perfundierten Rattenleber,sowie im Perfusionsmedium gefunden (SCHIMASSEK 1963 a).Auch der β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat-Quotient im Perfusionsmedium stimmte mit einem Wert um Eins mit Literaturangaben überein (FORSANDER et al.1965, SCHOLZ et al.1966,KREBS et al.1969) und änderte sich gleichfalls nicht während des Perfusionsverlaufs.Im Rattenlebergewebe in vivo scheint der Quotient allerdings doppelt so hoch zu sein (WILLIAMSON et al.1967).Auf die Metyraponzugabe in einer Endkonzentration von 5 mM reagierten der Lactat/Pyruvat-Quotient und der β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat-Quotient nahezu gleichartig.Beide Quotienten erhöhten sich innerhalb einer Stunde um das Fünf.- bis Sechsfache,verglichen mit Perfusionen ohne Metyraponzusatz.Während der rasche Anstieg des Lactat/Pyruvat-Quotienten fast ausschließlich durch die Zunahme der Lactatkonzentration verursacht wurde,spielte bei dem β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat-Quotienten ein initialer Abfall der Acetoacetatkonzentration eine gleich große Rolle,wie die Zunahme der β -Hydroxybutyratkonzentration.

Aus den Substratquotienten und der Gleichgewichtskonstanten des zugehörigen Enzymsystems läßt sich,wie in der Einleitung gezeigt wurde,das Verhältnis der freien Pyridinnucleotide für das entsprechende Zellkompartiment berechnen. Es wurden hierbei die von WILLIAMSON et al (1967) für 38°C, pH 7 und eine Ionenstärke von 0,25 neubestimmten Gleich-

gewichtskonstanten der Lactatdehydrogenase mit $1,11 \cdot 10^{-4}$ M und der β -Hydroxybutyratdehydrogenase mit $4,93 \cdot 10^{-2}$ M eingesetzt.

Die für den Zeitpunkt "90 min" im Perfusionsverlauf errechneten Werte sind in Abb.16 wiedergegeben.

	ZYTOSOLASMA (LDH-System)		MITOCHONDRIEN (β -HBDH-System)	
Metyrapon	0	5 mM	0	5 mM
$\frac{[NAD^+]}{[NADH]}$ frei	890	160	21	3,2
$E' \text{ (mV)}$	-234,8	-257,8	-269,6	-294,5

Abb.16 Redoxverschiebungen im Zytoplasma und im mitochondrialen Raum durch Metyrapon (5 mM).

Die errechneten Redoxpotentiale der Substratpaare Lactat-Pyruvat und β -Hydroxybutyrat-Acetoacetat in der unteren Spalte der Abbildung zeigen eine entsprechend starke Negativierung. Dieser Ausrechnung lagen die angenommenen Normalpotentiale E_0 (bei pH 7 und 37°C) von - 204 mV für Lactat-Pyruvat und von - 270 mV für β -Hydroxybutyrat-Acetoacetat von BÜCHER und RÜSSMANN (1963) zugrunde. Die starke Verschiebung des Verhältnisses der freien Pyridinnucleotide zur reduzierten Seite in den beiden Zellkompartimenten stellt

einen erheblichen Eingriff in den Stoffwechsel der Leberzelle dar. Alle Dehydrogenasen, die mit den freien Pyridinnucleotiden im Gleichgewicht stehen, sind dadurch betroffen. In Bezug auf die Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase wäre z.B. eine Umkehrung der Glycolyse in Gluconeogenese vorstellbar (WILLIAMSON et al. 1967).

2) Änderung des Sauerstoffverbrauchs der isoliert perfundierten Rattenleber durch Metyrapon

Die Zunahme der reduzierten Pyridinnucleotide in den beiden Zellkompartimenten läßt an eine Hemmung der Reoxydation durch die mitochondriale Atmungskette denken. Da das reduzierte Pyridinnucleotid den Hauptlieferanten des im Intermediärstoffwechsel anfallenden Wasserstoffs an die mitochondriale Atmungskette darstellt, wäre eine Verminderung der mitochondrialen Atmung, i.e. des Sauerstoffverbrauchs, zu erwarten. Eine Abnahme der mitochondrialen Atmung wäre aber auch möglich durch eine Behinderung des Wasserstoffflusses vom Zytoplasma in das Mitochondrieninnere, weil dann weniger Wasserstoff für die mitochondriale Atmungskette zur Verfügung stünde. Diese Möglichkeit scheidet aber aus, weil der Redoxzustand im mitochondrialen Raum, bei ungestörter Funktion der Atmungskette, nach der oxydierten Seite hin verschoben sein müßte. Die Annahme einer mitochondrialen Atmungshemmung wird durch Versuche von KAHL (1969) und KAHL und NETTER (1970) erhärtet, die eine Halbhemmung der Atmung an isolierten Rattenlebermitochondrien und Rattenleberschnitt-

ten durch 5 mM Metyrapon beobachtet hatten. In wieweit diese Versuche repräsentativ für das intakte Organ sein würden, war zunächst fraglich, da z.B. beträchtliche Unterschiede zwischen Leberschnitten und der isoliert perfundierten Rattenleber in Bezug auf Redoxzustand und Stoffwechselleistungen, wie Gluconeogenese und Ketonkörperproduktion, bestehen (KREBS et al. 1969). Auch ist eine schonende Isolierung von Mitochondrien bekanntermaßen methodisch problematisch. Aus diesem Grund wurde die Atmung der isoliert perfundierten Rattenleber vor und nach Metyraponzugabe (5 mM) gemessen. Der Sauerstoffverbrauch lag vor Metyraponzugabe bei $390 \mu\text{A O}_2/\text{Stunde}$ und Gramm Leberfeuchtgewicht. Aus der Literatur sind Werte um $300 \mu\text{A O}_2/\text{Stunde}$ und Gramm Leberfeuchtgewicht für die blutige (SCHIMASSEK 1962, FORSANDER et al. 1965) und die hämoglobinfreie (SCHOLZ et al. 1966) Rattenleberperfusion zu entnehmen. Der höhere Sauerstoffverbrauch in diesen Versuchen hat vermutlich seine Ursache in der vorgegebenen Glucosekonzentration des Perfusionsmediums, die um ein Mehrfaches höher lag, als bei den genannten Autoren. Nach Metyraponzugabe sank der Sauerstoffverbrauch auf ungefähr die Hälfte ab. Das gleichartige Verhalten der isolierten Mitochondrien, Leberschnitte und des intakten Organs dürfte den mitochondrialen Angriffspunkt von Metyrapon in Bezug auf die Zellatmung endgültig bewiesen haben. Darüberhinaus läßt sich aus der guten Reproduzierbarkeit der Atmungshemmung an den drei Systemen ableiten, daß Membranschranken für die Metyraponwir-

kung auf die Zellatmung offenbar keine besondere Rolle spielen. Dafür sprechen auch die Versuche an der isoliert perfundierten Rattenleber, bei denen der Sauerstoffpartialdruck kontinuierlich im ausfließenden Leberblut gemessen wurde. Dabei zeigte sich sofort nach Metyraponzugabe ein Anstieg des Sauerstoffpartialdruckes, was einer verminderten Sauerstoffaufnahme der Leber entsprach. Der Maximaleffekt war nach weniger als zehn Minuten erreicht und hielt über eine Stunde unvermindert an. Der schnelle Eintritt der Metyraponwirkung läßt eine rasche Ausbreitung des Hemmstoffs in der Leber annehmen, was die gute Permeabilität der betroffenen Membranen für Metyrapon nochmals hervorhebt. Nach Untersuchungen von KAHL (1970) wird Metyrapon in der isoliert perfundierten Rattenleber zu seinem Hauptmetaboliten, dem reduzierten Metyrapon, umgewandelt, der nicht weiter metabolisiert wird und annähernd gleich stark wirksam ist wie die Ausgangssubstanz (KAHL und NETTER 1970). Diese Befunde machen die lang anhaltende Metyraponwirkung auf die isoliert perfundierte Rattenleber verständlich.

3) Vergleich der Metyraponeffekte mit denjenigen von Amobarbital (Amytal^R)

Der mitochondriale Angriffspunkt von Metyrapon konnte durch Untersuchungen präzisiert werden, in denen Mitochondrien mit β -Hydroxybutyrat als Substrat unter Metyrapon eine Atmungshemmung zeigten (KAHL 1969), während die succinatab-

hängige Atmung nur unwesentlich beeinflußt wurde (KAHL in Vorbereitung). Der Angriffspunkt wäre demnach vor dem Coenzym Q, am Anfangsteil der Atmungskette zu suchen. Amytal^R (Amobarbital), ein klassischer Hemmstoff der mitochondrialen Atmungskette, blockiert ebenfalls in dieser Region (ERNSTER et al. 1955, CHANCE und HOLLUNGER 1963). Ein Vergleich mit der Amytalwirkung unter ähnlichen Versuchsbedingungen bietet sich mit einer Arbeit von SCHOLZ et al. (1966) an, in der unter anderem Redoxzustand und Sauerstoffverbrauch der isoliert perfundierten Rattenleber unter Amytal^R untersucht wurden. Es zeigte sich hier unter 3 mM Amytal^R eine maximal mögliche Atmungshemmung von 66 Prozent der Ausgangsatmung. Die Hälfte der durch Amytal^R unbeeinflussten Atmung wurde auf die Veratmung von dem an flavinhaltige Coenzyme gebundenen Wasserstoff zurückgeführt, der hinter der durch Amytal^R blockierten Stelle noch in die Atmungskette eingeschleust werden kann (s. auch KREBS et al. 1961). In diesem Sinne wird auch die verminderte Sensibilität gegenüber Amytal^R bei vorliegendem Fettsäurekatabolismus verstanden, da hier mehr flavingebundener Wasserstoff im Verhältnis zu pyridinnucleotidgebundenem Wasserstoff entsteht, als bei dem Kohlehydratkatabolismus. Auch Metyrapon zeigte bei der relativ hohen Konzentration von 5 mM nur eine Atmungshemmung von ungefähr 60 Prozent. Die Aufstellung einer Dosiswirkungskurve der Atmungshemmung bei verschiedenen Stoffwechsellagen wird zeigen in wie weit dies bezüglich Gemeinsamkeiten mit Amytal^R

bestehen. Die im Perfusionsmedium gemessenen Redoxquotienten Lactat/Pyruvat und β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat wiesen auch unter Amytal^R ähnliche Bewegungen wie unter Metyrapon auf. Allerdings ist zu berücksichtigen, daß in den Versuchen von SCHOLZ (1966) eine Einwirkungszeit von nur zehn Minuten vorlag und in den Versuchen mit Metyrapon dieser Arbeit dagegen sechzig Minuten. Bei einer Amytalkonzentration von 3 mM stieg der Lactat/Pyruvat-Quotient von 8 auf 30, entsprechend einer Verschiebung der Redoxpotentiale von - 231 mV auf - 247 mV und der β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat-Quotient von Werten um 1 auf Werte um 4, entsprechend - 268 mV und - 289 mV. Auch die Lactat- und β -Hydroxybutyratproduktion lag innerhalb der ersten 30 Minuten mit 80 μ Mol pro Stunde und Gramm Leberfeuchtgewicht bzw. 8 μ Mol pro Stunde und Gramm Leberfeuchtgewicht unter 5 mM Metyrapon in der gleichen Größenordnung wie unter Amytal^R (10 Minuten Einwirkungszeit), wo Werte von 100 μ Mol pro Stunde und Gramm Leberfeuchtgewicht bzw. 4 μ Mol pro Stunde und Gramm Leberfeuchtgewicht erreicht wurden. Die einander sehr ähnlichen Auswirkungen der beiden Hemmstoffe auf die Atmung und den Redoxzustand der Leberzelle dürften deshalb einen benachbarten oder gleichen Wirkort in der mitochondrialen Atmungskette nahelegen.

4) Versuche zur Hemmung der Lactatdehydrogenase und der β -Hydroxybutyratdehydrogenase in vitro

Nach den bereits zitierten Versuchen von KAHL (1969) an Mitochondrien läßt sich aber nicht sagen, in welchem Bereich vor dem Coenzym Q Metyrapon angreift. Darüberhinaus wäre, bei der Verwendung von β -Hydroxybutyrat als Substrat, die Vortäuschung eines Angriffs an der Atmungskette im Falle einer Hemmung der β -Hydroxybutyratdehydrogenase denkbar, zumal in einer Arbeit von DEAN und WHITEHOUSE (1967) von einer Hemmung des Enzyms und zwei weiterer NAD-gebundener Dehydrogenasen durch Metyrapon berichtet wird. Eine Hemmung der β -Hydroxybutyratdehydrogenase wäre erstens deswegen interessant, weil das β -Hydroxybutyrat-Acetoacetatsystem (DEVLIN und BEDELL 1960, KREBS 1961) neben dem α -Glycerophosphat-Dihydroxyacetonphosphatsystem (BÜCHER und KLINGENBERG 1958) und Malat-Oxalatsystem (KREBS 1967) als Wasserstoffcarrier zwischen Zytoplasma und mitochondrialen Raum diskutiert wird. Zweitens könnte bei einer Hemmung des Enzyms ein Aktivitätsminimum erreicht werden, das nicht mehr ausreicht eine richtige Anzeige des Verhältnisses der freien Pyridinnucleotide durch den β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat-Quotienten zu gewährleisten (s. Einleitung).

Drittens schließlich, könnte eine Hemmung einen Hinweis auf einen möglichen Ort des reduktiven Abbaus von Metyrapon bedeuten, wobei die letzten zwei Gesichtspunkte auch für die Lactatdehydrogenasen zutäfen. Aus diesen Gründen wurden die beiden Dehydrogenasen in vitro auf ihre Hemmbarkeit durch

Metyrapon untersucht. Die β -Hydroxybutyratdehydrogenase zeigte, wie aus den Abbildungen 14 und 15 ersichtlich ist, keinen Anhalt für eine Hemmung durch den Inhibitor, desgleichen die Lactatdehydrogenase in den Abbildungen 12 und 13. Die Michaeliskonstanten der β -Hydroxybutyratdehydrogenase (BERGMEYER et al. 1967) und der Lactatdehydrogenase (ZEWE und FROMM 1962) stimmen mit den Literaturangaben überein. Bei allen kinetischen Versuchen wurde die Reaktion mit dem Enzym gestartet. Es muß allerdings hinzugefügt werden, daß sich in ähnlicher Weise, wie es in der Arbeit von DEAN und WHITEHOUSE (1967) an der Alkoholdehydrogenase gezeigt wurde (das Enzym wurde dort bis zu 60 Minuten bei 0°C mit dem Hemmstoff praeinkubiert und nach Wiedererwärmen mit den fehlenden Komponenten des Ansatzes gestartet), in einigen Versuchen nach der Praeinkubation bei der β -Hydroxybutyratdehydrogenase eine Tendenz zur Hemmung zeigte. Diese Effekte bedürfen aber noch weiterer Untersuchungen. Gegen eine Verursachung der Veränderungen von Atmung und Redoxzustand der Leberzelle durch eine vielleicht mögliche in-vivo-Hemmung der β -Hydroxybutyratdehydrogenase mit Metyrapon spricht aber, daß, bei einer Aktivität der β -Hydroxybutyratdehydrogenase im Rattenlebergewebe von 1255 μ Mol gebildetes NADH pro Stunde und Gramm Leberfeuchtgewicht bei 20°C (LEHNINGER et al. 1960), nur eine ganz massive Hemmung, wenn überhaupt, zu solchen Veränderungen führen könnte und von der zu erwarten wäre, daß sie sich auch in vitro ohne Praeinkubation zeigen würde; zum anderen konnte Metyrapon die Atmung von

elektronentransportierenden Partikeln (ESTABROOK und NETTER 1968) und vorgeschädigten Mitochondrien (KAHL in Vorbereitung), die NADH als Substrat verbrauchten, in ähnlicher Weise hemmen, wie die β -hydroxybutyratabhängige Atmung in den Versuchen von KAHL (1969). Obwohl in dieser Arbeit eine Hemmung der β -Hydroxybutyratdehydrogenase unter in-vi-v-o-Bedingungen also nicht ausgeschlossen werden kann, lassen sich die Veränderungen von Atmung und Redoxzustand der Leberzelle jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit auf einen Angriffspunkt von Metyrapon am Anfangsteil der mitochondrialen Atmungskette zwischen dem reduzierten Pyridinnucleotid und dem Coenzym Q zurückführen.

ZUSAMMENFASSUNG

In einer Konzentration von 5 mM verursachte Metyrapon (Metopirone^R) an der isoliert perfundierten Rattenleber einen Anstieg des Lactat/Pyruvat-Quotienten und des β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat-Quotienten um das Fünf.- bis Sechsfache im Perfusionsmedium und eine Halbhemmung der Atmung.

Die Lactatdehydrogenase und β -Hydroxybutyratdehydrogenase zeigten in vitro in den untersuchten Reaktionsrichtungen keine wesentliche Beeinflussung durch den Hemmstoff. Es wird ein Amytal^R- ähnlicher Angriffspunkt von Metyrapon an der mitochondrialen Atmungskette der Leberzelle diskutiert.

LITERATURVERZEICHNIS

- BERGMEYER, H. U. Purification and properties of crystal-
GAWEHN, K. line 3-hydroxybutyrate dehydrogenase
KLOTZSCH, H. from rhodopseudomonas spheroides
KREBS, H. A. Biochem. J. 102, 423 (1967)
WILLIAMSON, D. H.
- BORST, P. Funktionelle und morphologische Organi-
 sation der Zelle (S. 148)
 Springer Verlag, Berlin (1963)
- BRAUER, R. W. Isolated rat liver preparation. Bile pro-
FESSOTTI, R. L. duction and other basic properties
PIZZOLATO, P. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 78, 174 (1951)
- BÜCHER, TH. Wege des Wasserstoffs in der lebendigen
KLINGENBERG, M. Organisation
 Angew. Chem. 70, 552 (1958)
- BÜCHER, TH. Gleichgewicht und Ungleichgewicht im Sy-
RÜSSMAN, W. stem der Glykolyse
 Angew. Chem. 75, 881 (1963)
- CHANCE, B. Inhibition of electron and energy trans-
HOLLUNGER, G. fer in mitochondria. I. Effects of Amytal,
 thiopental, rotenone, progesterone and
 methylene glycol
 J. biol. Chem. 238, 418 (1963)
- CHART, J. J. New amphenone analogs as adrenocortical
SHEPPARD, H. inhibitors
ALLEN, M. J. Experientia 14, 151 (1958)
BENCZE, W. L.
GAUNT, R.

- COOPER, D.Y. Photochemical action spectrum of the
LEVIN, S. terminal oxidase of mixed function
NARASIMHULU, S. oxidase systems
ROSENTHAL, O. Science 147, 200 (1965)
ESTABROOK, R.W.
- COOPER, D.Y. Role of cytochrome P-450 in mixed func-
SCHLEYER, H. tion oxidase using the reconstituted
ROSENTHAL, O. steroid 11- β -hydroxylase of adrenal
mitochondria as an example
Hoppe-Seylers Z.phys.Chem. 349, 1592
(1968)
- DEAN, P.D.G. The effects of mepyrapone (SU 4885) and
WHITTHEOUSE, M.W. some hypercholesterolaemic drugs on hepa-
tic sterol and fatty acid oxidation
Biochem.Pharmac. 16, 441 (1967)
- DEVLIN, T.M. Effect of acetoacetate on the oxidation
BEDELL, B.H. of reduced diphosphopyridine nucleotide
by intact rat liver mitochondria
J.biol.Chem. 235, 2134 (1960)
- DIXON, M. The determination of enzyme inhibitor
constants
Biochem.J. 55, 170 (1953)
- ERICKSON, R.E. Effect of SU 4885 on steroid 18-hydroxy-
ERTEL, R.J. lation in the mouse adrenal in vitro
UNGAR, F. Endocrinol. 78, 343 (1966)
- ERNSTER, L. The action of 5-ethyl-5-isoamylbarbitu-
LÖW, H. rate (amytal) on the oxidation of reduced
LINDBERG, O. diphosphopyridine nucleotide (DPNH) in
rat liver mitochondria
Acta Chem.Scand. 9, 200 (1955)

- ESTABROOK, R.W. The light reversible carbon monoxide
COOPER, D.Y. inhibition of the steroid C₂₁-hydroxy-
ROSENTHAL, O. lase system of the adrenal cortex
Biochem.Z. 338, 741 (1963)
- ESTABROOK, R.W. Unveröffentliche Versuche (1968)
NETTER, K.J.
- FORSANDER, O.A. Influence of ethanol on the liver meta-
RÁTHÁ, N. bolism of fed and starved rats
SALASPURO, M. Biochem.J. 94, 259 (1965)
MÄENPÄÄ, P.
- GILLETTE, J.R. Mechanism of p-nitrobenzoate reduction
KAMM, J.J. in liver: the possible role of cytochrome
SASAME, H.A. P-450 in liver microsomes
Molec.Pharmac. 4, 541 (1968)
- HEMS, R. Gluconeogenesis in the perfused rat liver
ROSS, B.D. Biochem.J. 101, 284 (1966)
BERRY, M.N.
KREBS, H.A.
- HOHORST, H.J. Über Metabolitgehalte und Metabolitkon-
KREUTZ, F.H. zentrationen in der Leber der Ratte
BÜCHER, TH. Biochem.Z. 332, 18 (1959)
- HOLZER, H. Bestimmung des Quotienten DPNH/DPN in
SCHULTZ, G. lebenden Hefezellen durch Analyse sta-
LYNEN, F. tionärer Alkohol.- und Acetaldehydkon-
Biochem.Z. 328, 252 (1956)
- JENKINS, J.S. Inhibition of adrenal steroid 11-oxygen-
MEAKIN, J.W. tion in the dog
NELSON, D.H. Science 128, 478 (1958)
THORN, G.W.

- JENKINS, J. S. An inhibitor of adrenal steroid
11-hydroxylation
Proc. roy. Soc. Med. 52, 260 (1959)

- KAHL, G. F. Zur Wirkung von Metyrapon auf Elektronen-
transportvorgänge in der Leberzelle
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. u. exp.
Path. 264, 251 (1969)

- KAHL, G. F. Die Wirkungen von Metyrapon auf den Arz-
neimittelstoffwechsel und einige andere
Funktionen der Leberzelle
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. u. exp.
Path. 263, 225 (1969)

- KAHL, G. F. Experiments on the metyrapone reducing
microsomal enzyme system
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. 266,
51, (1970)

- KAHL, G. F. The effect of metyrapone on cellular
respiration and microsomal drug oxidation
Biochem. Pharmac. 19, 27 (1970)

- KAHNT, F. W. On the specific inhibition of adrenal
steroid biosynthesis
Experientia 18, 499 (1962)

- KLINGENBERG, M. Wege des Wasserstoffs in den Mitochon-
drien
HÄFEN, H.
Biochem. Z. 337, 120 (1963)

- KRAULIS, I. Hydroxylation sequences in rat adrenal
steroids and effects of SU 4885 on
C-18-oxygenation
BIRMINGHAM, M. K.
Fed. Proc. 24, 530 (1965)

- | | |
|--|---|
| LIDDLE, G. W.
ISLAND, D.
LANCE, F. M.
HARRIS, A. P. | Alteration of adrenal steroid patterns
in man from treatment with a chemical
inhibitor of 11- β -hydroxylation
J. Clin. Endocrinol. and Metab. <u>18</u> , 906
(1958) |
| LINEWEAVER, H.
BURK, D. | The determination of enzyme dissocia-
tion constants
J. Amer. Chem. Soc. <u>56</u> , 658 (1934) |
| LJUNGGREN, G. | Darstellung von Acetessigsäurelösung
Biochem. Z. <u>145</u> , 422 (1924) |
| LUCHSINGER, B. | Dissertation, Zürich 1875 |
| MASON, H. S. | Mechanism of oxygen metabolism
Advanc. Enzymol. <u>19</u> , 79 (1957) |
| MEIERS, H. G.
FLAMMANN, J.
ALBAUM, G.
STAIB, W. | Zur Methode der Perfusion isolierter
Rattenlebern.
Biochem. Z. <u>344</u> , 514 (1966) |
| MILLER, L. L.
BLY, C. G.
WATSON, M. L.
BALE, W. F. | The dominant role of the liver in plasma
protein synthesis
J. exp. Med. <u>94</u> , 431 (1951) |
| MILLER, L. L.
BALE, W. F. | Synthesis of all plasma protein fractions
except gamma globulins by the liver
J. exp. Med. <u>99</u> , 125 (1954) |
| MILLER, L. L.
GREEN, M. | Protein catabolism and protein synthesis
in perfused livers of normal and alloxan-
diabetic rats
J. biol. Chem. <u>235</u> , 1 (1960) |

- NETTER, K. J. Über die Wirkung von Metyrapon auf den
JENNER, S. mikrosomalen Arzneimittelabbau
KAJUSCHKE, K. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. u. exp.
Path. 259, 1 (1967)
- NETTER, K. J. Kinetic experiments on the binding of
KAHL, G. F. metyrapone to liver microsomes
MAGNUSSEN, M. P. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. 265,
205 (1969)
- OMURA, T. Function of cytochrome P-450 of microsomes
SATO, R. Fed. Proc. 24, 1181 (1965)
COOPER, D. Y.
ROSENTHAL, O.
ESTABROOK, R. W.
- PETTE, D. Plan und Muster im zellulären Stoffwechsel
Naturwissenschaften 52, 597 (1965)
- SALWAY, J. G. The simultaneous determination of aceto-
acetate and glucose in capillary blood
Clin. Chim. Acta 25, 109 (1969)
- SCHENKMAN, J. B. Spectral studies of drug interaction
REMMER, H. with hepatic microsomal cytochrome
ESTABROOK, R. W. Molec. Pharmacol. 3, 113 (1967)
- SCHIMASSEK, H. Perfusion of isolated rat liver with a
semisynthetic medium and control of li-
ver function
Life Sci. 11, 629 (1962)
- SCHIMASSEK, H. Metabolite des Kohlehydratstoffwechsels
der isoliert perfundierten Rattenleber
Biochem. Z. 336, 460 (1963) a

- SCHIMASSEK, H. Der Einfluß der Leber auf den extrazellulären Redox-Quotienten Lactat/Pyruvat. Versuche an der isoliert perfundierten Rattenleber
Biochem.Z. 330, 468 (1963) b
- SCHOLZ, R. Barbiturate und energieliefernder Stoffwechsel in der hämoglobinfrei durchströmten Rattenleber
SCHWARZ, F.
BÜCHER, TH.
Z.klin.Chem. 4, 179 (1966)
- SCHOLZ, R. in "Stoffwechsel der isoliert perfundierten Rattenleber" (Ersch. STAIB, W.; SCHOLZ, R.) S. 25
Springer Verlag, Heidelberg (1965)
- SPRUNT, J. G. Some aspects of the pharmacology of metyrapone
BROWNING, M. C. K.
HANNAH, D. H.
Med.Soc.Endocrinol. 17, 193 (1967)
- SWEAT, M. L. Studies of the oxidation state of partially purified adrenal cortex mitochondrial cytochrome P-450 and difference spectra induced by deoxycorticosterone and metopirone
YOUNG, R. B.
BRYSON, M. J.
Arch.Biochem. 130, 66 (1969)
- WILLIAMSON, D. A. The redox state of free nicotinamide-adenine-dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver
LUND, P.
KREBS, H. A.
Biochem.J. 104, 514 (1967)
- ZEWE, V. Kinetic studies of rabbit muscle lactat dehydrogenase
FROMM, H. J.
J.biol.Chem. 237, 1668 (1962)

TABELLEN

LACTAT (zu S.21 u.22)

Perfusionszeit (min)						
Nr.	LW	30	60	90	120	150
1	0,819	1,257	5,493			
2	1,270	2,259	9,260	7,130	2,680	4,024
3	0,890	3,036	8,500	10,770	11,226	
4	1,060	2,090	3,940	6,040	3,500	4,210
5	0,932	2,132	5,945	7,993	7,851	7,993
6	0,847	2,680	8,600	11,300	11,300	10,310
a	0,635	1,793	1,822		1,120	0,790
b	0,876	3,177	3,686	3,050	2,062	2,062
c		1,640	1,270	1,210	1,360	1,480

PYRUVAT (zu S.23)

Perfusionszeit (min)						
Nr.	LW	30	60	90	120	150
1	0,016	0,100	0,086			
2	0,025	0,225	0,130	0,070	0,050	0,055
3	0,020	0,492	0,224	0,192	0,168	
4	0,040	0,260	0,144	0,104	0,086	0,072
5	0,024	0,234	0,224	0,274	0,184	0,184
6	0,010	0,490	0,265	0,305	0,275	0,265
a	0,028	0,358	0,298		0,158	0,158
b	0,020	0,410	0,400	0,290	0,270	0,290
c		0,240	0,180	0,125	0,105	0,100

Einzelwerte der Substratkonzentrationen (mM) im Perfusionsmedium zu verschiedenen Perfusionszeiten. LW: Konzentrationen im Perfusionsmedium vor Leberkontakt. Nr. 1-6: Perfusionen mit Metyrapon (5mM). Nr. a-c: Perfusionen ohne Metyrapon.

B-HYDROXYBUTYRAT (zu S.25 u.26)

Perfusionszeit (min)						
Nr.	LW	30	60	90	120	150
1	o	0,180	0,590			
2	o	0,140	1,230	2,080	2,900	2,050
3	o	0,180	0,750	1,520	2,490	
4	o	0,022	0,430	0,730	0,930	1,480
5	o	0,060	0,390	0,520	1,130	1,310
6	o	0,240	0,600	1,170	1,760	2,390
a	o	0,080	0,180		0,210	0,210
b	o	0,215	0,260	0,340	0,340	0,560
c	o	0,195	0,300	0,350	0,440	0,500

ACETOACETAT (zu S.27 u.28)

Perfusionszeit (min)						
Nr.	LW	30	60	90	120	150
1	0,010	0,437	0,207			
2	0,003	0,303	0,187	0,537	0,800	0,822
3	0,007	0,213	0,103	0,183	0,360	
4	o	0,137	0,093	0,167	0,313	0,410
5	0,007	0,160	0,093	0,110	0,218	0,260
6	0,012	0,158	0,083	0,117	0,225	0,358
a	o	0,156	0,214		0,347	0,377
b	o	0,168	0,240	0,307	0,365	0,468
c		0,267	0,340	0,425	0,504	0,583

Einzelwerte der Substratkonzentrationen (mM) im Perfusionsmedium zu verschiedenen Perfusionszeiten. LW: Konzentrationen im Perfusionsmedium vor Leberkontakt.
 Nr.1-6: Perfusionen mit Metyrapon (5 mM). Nr.a-c: Perfusionen ohne Metyrapon.

LACTAT/PYRUVAT-QUOTIENT (zu S.24 u.25)

Perfusionszeit (min)

Nr.	30	60	90	120	150
1	12,570	63,872			
2	10,040	71,231	101,857	53,600	73,164
3	6,171	37,946	56,094	66,821	
4	8,038	27,361	58,077	40,698	58,472
5	9,111	26,540	29,172	42,668	43,440
6	5,469	32,453	37,049	41,091	38,906
a	5,008	6,114		7,089	5,000
b	7,749	9,215	10,517	7,637	7,110
c	6,833	7,056	9,680	12,952	14,800

B-HYDROXYBUTYRAT/ACETOACETAT-QUOTIENT (zu S.28 u.29)

Perfusionszeit (min)

Nr.	30	60	90	120	150
1	0,381	2,850			
2	0,462	0,578	5,873	3,625	2,494
3	0,845	7,282	8,306	6,917	
4	0,101	4,624	4,371	2,971	3,610
5	0,375	4,194	4,727	5,183	5,038
6	1,519	7,229	10,000	7,822	6,676
a	0,513	0,841		0,605	0,557
b	1,280	1,083	1,107	0,932	1,197
c	0,730	0,867	0,824	0,873	0,858

Einzelwerte der Substratquotienten im Perfusionsmedium zu verschiedenen Perfusionszeiten.

Nr.1-6: Perfusionen mit Metyrapon (5mM).Nr.a-c: Perfusionen ohne Metyrapon.

LACTAT (zu S. 21 u. 22)

		Perfusionszeit (min)				
Nr. 1-6	LW	30	60 ⁺	90 ⁺	120	150 ⁺
$\bar{X}$	0,9696	2,2423	6,9563	8,6466	7,3114	6,6343
s	0,1694	0,6045	2,1285	2,2952	4,1079	3,0577
$s\bar{X}$	0,0691	0,2467	0,8689	1,0264	1,8371	1,5288
Nr. a-c						
$\bar{X}$	0,7555	2,2033	2,2593	2,1300	1,5100	1,4440
s	0,1702	0,8466	1,2659	1,3010	0,4895	0,6367
$s\bar{X}$	0,1203	0,4887	0,7308	0,9199	0,2826	0,3676

PYRUVAT (zu S. 23)

		Perfusionszeit (min)				
Nr. 1-6	LW	30	60	90	120	150
$\bar{X}$	0,0215	0,3002	0,1788	0,1890	0,1526	0,1440
s	0,0100	0,1578	0,0685	0,1019	0,0877	0,0984
$s\bar{X}$	0,0041	0,0644	0,0279	0,0455	0,0392	0,0492
Nr. a-c						
$\bar{X}$	0,0240	0,3360	0,2926	0,2075	0,1776	0,1826
s	0,0055	0,0871	0,1100	0,1166	0,0842	0,0909
$s\bar{X}$	0,0039	0,0502	0,0635	0,0824	0,0486	0,0559

Mittelwerte ($\bar{X}$), Standardabweichung (s) und mittlerer Fehler des Mittelwertes ($s\bar{X}$) der Substratkonzentrationen im Perfusionsmedium zu verschiedenen Perfusionszeiten. LW: Konzentrationen im Perfusionsmedium vor Leberkontakt. Nr. 1-6: Perfusionen mit Metyrapon (5 mM). Nr. a-c: Perfusionen ohne Metyrapon. Signifikante Unterschiede (s. unter Methoden) sind mit einem Kreuz (+) gekennzeichnet.

B-HYDROXYBUTYRAT (zu S.25 u.26)

Perfusionszeit (min)						
Nr.1-6	30	60	90 ⁺	120 ⁺	150 ⁺	
$\bar{X}$	0,1370	0,6650	1,2040	1,8420	1,8075	
s	0,0812	0,3056	0,6246	0,8491	0,5008	
s $\bar{X}$	0,0331	0,1247	0,2793	0,3797	0,2504	
Nr.a-c						
$\bar{X}$	0,1633	0,2467	0,3450	0,3300	0,4233	
s	0,0728	0,0611	0,0071	0,1153	0,1872	
s $\bar{X}$	0,0420	0,0353	0,0050	0,0666	0,1081	

ACETOACETAT (zu S.27 u.28)

Perfusionszeit (min)						
Nr.1-6	30	60 ⁺	90	120	150	
$\bar{X}$	0,2407	0,1277	0,2228	0,3832	0,4625	
s	0,1286	0,0543	0,1784	0,2406	0,2476	
s $\bar{X}$	0,0525	0,0222	0,0798	0,1076	0,1238	
Nr.a-c						
$\bar{X}$	0,1970	0,2667	0,3660	0,4053	0,4760	
s	0,0608	0,0699	0,0834	0,0858	0,1032	
s $\bar{X}$	0,0351	0,0403	0,0589	0,0496	0,0596	

Mittelwerte ($\bar{X}$), Standardabweichung (s) und mittlerer Fehler des Mittelwertes ($s\bar{X}$) der Substratkonzentrationen im Perfusionsmedium zu verschiedenen Perfusionszeiten.

Nr.1-6: Perfusionen mit Metyrapon (5 mM). Nr.a-c: Perfusionen ohne Metyrapon. Signifikante Unterschiede (s. unter Methoden) sind mit einem Kreuz (+) gekennzeichnet.

LACTAT/PYRUVAT-QUOTIENT (zu S.24 u.25)

Perfusionszeit (min)						
Nr.1-6	30	60 ⁺	90 ⁺	120 ⁺	150 ⁺	
$\bar{X}$	8,5665	43,2338	56,4498	48,9756	53,4955	
s	2,6118	19,4144	28,2182	11,2951	15,5519	
$s\bar{X}$	1,0663	7,9259	12,6196	5,0513	7,7759	
Nr.a-c						
$\bar{X}$	6,5300	7,4617	10,0985	9,2260	8,9700	
s	1,3954	1,5898	0,5918	3,2384	5,1580	
$s\bar{X}$	0,8056	0,9179	0,4185	1,8697	2,9780	

β -HYDROXYBUTYRAT/ACETOACETAT-QUOTIENT (zu S.28 u.29)

Perfusionszeit (min)						
Nr.1-6	30	60 ⁺	90 ⁺	120 ⁺	150 ⁺	
$\bar{X}$	0,6238	5,4595	6,2554	5,3036	4,4545	
s	0,4922	1,8337	2,7290	2,0748	1,8104	
$s\bar{X}$	0,2010	0,7486	1,2204	0,9279	0,9052	
Nr.a-c						
$\bar{X}$	0,2410	0,9303	0,9655	0,8033	0,8707	
s	0,3954	0,1328	0,2001	0,1742	0,3202	
$s\bar{X}$	0,2283	0,0767	0,1415	0,1006	0,1849	

Mittelwerte ($\bar{X}$), Standardabweichung (s) und mittlerer Fehler des Mittelwertes ($s\bar{X}$) der Substratquotienten im Perfusionsmedium zu verschiedenen Perfusionszeiten. Nr.1-6: Perfusionen mit Metyrapon (5 mM). Nr.a-c: Perfusionen ohne Metyrapon. Signifikante Unterschiede sind mit einem Kreuz (+) gekennzeichnet.

SAUERSTOFFVERBRAUCH (zu S.31)

vor Metyraponzugabe

t (min)	60	30	5
Nr. 1	435,6	480,0	492,0
2	361,2	418,8	406,8
3	372,0	252,0	324,0
$\bar{X}$	389,6000	383,6000	407,6000
s	40,2014	118,0054	84,0026
$s\bar{X}$	23,2109	68,1324	48,5004

nach Metyraponzugabe

t (min)	20	40	60
Nr. 1	264,0	168,0	148,0
2	180,0	139,2	132,0
3	114,0		128,4
$\bar{X}$	186,0000	153,6000	136,4000
s	75,1797	20,3646	10,8885
$s\bar{X}$	43,4062	14,4000	6,2866

Sauerstoffverbrauch der isoliert perfundierten Rattenleber zu verschiedenen Zeiten (min) vor und nach der Metyraponzugabe (5 mM) in μ A Sauerstoff/Stunde und Gramm Leberfeuchtgewicht.

LACTATDEHYDROGENASE (zu S.33 u.34)

Substratabhängige Kinetik

Pyruvatkonzentration (mM)	0,4		0,2		0,1	
Metyraponkonzentration (mM)	5	0	5	0	5	0
Nr. 1	18	17	12	12	9	8
2	17	17	12	13	8	9
3	17	18	13	13	8	8
Mittelwert	17,3	17,3	12,3	12,7	8,3	8,3

(NADH-Konzentration in allen Ansätzen 0,2 mM)

Coenzymabhängige Kinetik

NADH-Konzentration (mM)	0,04		0,02		0,01	
Metyraponkonzentration (mM)	5	0	5	0	5	0
Nr. 1	21	22	18	19	12	12
2	20	21	19	19	13	12
3	19	20	17	18	13	12
Mittelwert	20	21	18	18,7	12,7	12

(Pyruvatkonzentration in allen Ansätzen 3 mM)

Hemmversuche der Lactatdehydrogenase in der Reaktionsrichtung Pyruvat nach Lactat. Änderung der Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion ($\Delta E_{366} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 1000$) unter Metyrapon (5 mM) bei verschiedenen Konzentrationen des Substrates, bzw. des Coenzyms.

β -HYDROXYBUTYRATDEHYDROGENASE (zu S.35 - 37)

Substratabhängige Kinetik

Metyraponkonzentration (mM)		0	2	4	8
β -Hydroxybutyrat-konzentration (mM)	2	12,5	12,2	12,5	10,1
	1	9,6	9,15	9,4	9,1
	0,5	7,4	7,6	6,9	6,9
	0,25	5,0	5,5	5,2	5,0

(NAD-Konzentration in allen Ansätzen 2 mM)

Coenzymabhängige Kinetik

Metyraponkonzentration (mM)		0	2	4	8
NAD-Konzentration (mM)	0,4	11,2	10,5	10,2	9,5
	0,2	9,9	9,2	9,2	9,3
	0,1	7,85	8,0	7,4	6,8
	0,05	5,75	5,75	5,4	4,7

(β -Hydroxybutyratkonzentration in allen Ansätzen 4 mM)

Hemmversuche der β -Hydroxybutyratdehydrogenase in der Reaktionsrichtung β -Hydroxybutyrat nach Acetoacetat. Änderung der Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion ($\Delta E_{366} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 1000$) unter verschiedenen Metyraponkonzentrationen bei verschiedenen Konzentrationen des Substrates, bzw. des Coenzym.

BESTIMMUNGSANSÄTZE FÜR ACETOACETAT, PYRUVAT UND
 B-HYDROXYBUTYRAT (zu S. 17)

1)	4,0 ml Perfusat 4,0 ml HClO_4 0,7 M 8,0 ml davon ca. 6,5 ml Überstand	
2)	ACETOACETAT/PYRUVAT	B-HYDROXYBUTYRAT
3)	1,25 ml Überstand 1,25 ml HClO_4 0,23 M 2,50 ml	1,25 ml Überstand 1,25 ml HClO_4 0,23 M 2,50 ml
4)	2,50 ml 0,50 ml K_2PO_4 1 M 3,00 ml	2,50 ml 0,20 ml NADH ca. 35 mM 0,30 ml KOH 2 M; K_2CO_3 0,65 M 3,00 ml
5)	2,00 ml 0,05 ml NADH ca. 15 mM 0,01 ml MDH 5 mg/ml nach 10 min ablesen 0,02 ml LDH 0,75 mg/ml nach 5 min 3-4 Meßpunkte 0,01 ml B-HBDH 5 mg/ml nach 30 min 3-4 Meßpunkte 2,09 ml	2,00 ml 1. Ablesung 0,01 ml B-HBDH 5 mg/ml nach 150 min 2. Ablesung 2,01 ml

- 1) Enteiweißung
- 2) zu bestimmendes Substrat
- 3) Verdünnung
- 4) Neutralisation
- 5) Testansatz

Versuchsbedingungen: s. Methoden

Zur Auswertung: Da sehr oft Extinktionsänderungen vorkamen, die nichts mit der eigentlichen Reaktion zu tun hatten (Schleichen)

wurden die Extinktionsdifferenzen graphisch durch Extrapolieren bestimmt. Im β - β -Hydroxybutyratansatz war das nicht möglich, da der Schleich über die lange Reaktionszeit (150 min) nicht konstant blieb. Hier wurde der Schleich des Perfusionsmediums vor Leberkontakt (Leerwert) als repräsentativ für die übrigen Proben angesehen und von diesen subtrahiert. Kontrollversuche (Zugabe von bekannten Substratmengen) bestätigen die Berechtigung dieses Vorgehens. Genauere Meßergebnisse sind aber zu erwarten, wenn die lange Reaktionszeit durch Erhöhung der Enzymaktivität im Testansatz abgekürzt wird.

Den Herren Professoren Kuschinsky und Netter sei an dieser Stelle für die Unterstützung und die Überlassung des Arbeitsplatzes gedankt.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Prof. Netter und Herrn Dr. Kahl für die Auswahl des Themas und die hervorragende Zusammenarbeit.

Lebenslauf

Am 12. April 1942 wurde ich als Sohn des Kaufmannes Friedrich Simon und seiner Ehefrau Susanne, geb. Frenzel in Leipzig geboren.

Nach der Volksschule trat ich Ostern 1953 in das Staatliche Gymnasium Alzey ein, wo ich im Februar 1962 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1962 begann ich das Medizinstudium an der Universität in Mainz. Nach der ärztlichen Vorprüfung im April 1965, studierte ich je ein Semester an den Universitäten Hamburg und Innsbruck. Danach kehrte ich wieder an die Universität in Mainz zurück, wo ich im Juli 1968 das medizinische Staatsexamen bestand.

Nach 4 Monaten Medizinalassistentenzeit an der dortigen Chirurgischen Klinik folgten 11 Monate im Pharmakologischen Institut Mainz, in dem die Untersuchungen zum Thema dieser Arbeit durchgeführt wurden.

